

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude des agonistes du récepteur TP dans un contexte athérogenèse : effets pro-inflammatoires et pro-migratoires du thromboxane A2 et de l'isoprostane sur les cellules musculaires lisses aortiques humaines

Jadot, Alexia

Award date:
2011

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

Etude des agonistes du récepteur TP dans un contexte athérogenèse : effets pro-inflammatoires et pro-migratoires du thromboxane A₂ et de l'isoprostane sur les cellules musculaires lisses aortiques humaines

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Alexia JADOT

Janvier 2011

Etude des agonistes du récepteur TP dans un contexte athérogénèse : effets pro-inflammatoires et pro-migratoires du thromboxane A₂ et de l'isoprostane sur les cellules musculaires lisses aortiques humaines.

JADOT Alexia

Résumé

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des artères de moyen et de gros calibres. Cette maladie est caractérisée par l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux dans la paroi artérielle. Cette accumulation déclenche différents processus conduisant au recrutement des cellules inflammatoires mais aussi à la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima. Cette migration est médiée via la libération de métalloprotéinases matricielles (MMP). L'athérosclérose est également influencée par de nombreux médiateurs dont le thromboxane A₂ et l'isoprostane, molécules dérivées de l'acide arachidonique. En effet, la production de thromboxane A₂ et d'isoprostane est anormalement élevée dans le sang des patients atteints d'athérosclérose ou encore dans les plaques athéromateuses. Ces deux médiateurs lipidiques agissent via le récepteur TP. Cependant, leurs rôles dans l'athérosclérose ne sont pas clairement définis. De plus, on ne dispose que de peu de données sur les cellules musculaires lisses humaines.

Notre objectif principal était d'évaluer les effets de deux agonistes du récepteur TP, le U46619, un analogue du thromboxane A₂, et le 8-iso-PGF_{2α} dans la production de MMPs par les cellules musculaires lisses aortiques humaines et l'induction à un phénotype inflammatoire dans ces cellules. Nous avons démontré que les agonistes du récepteur TP augmentent le niveau d'expression d'ARNm de différents gènes impliqués dans l'inflammation telles que ICAM-1, et de gènes impliqués dans la dégradation de la MEC tels que MMP2. De plus, ces molécules augmentent l'activité enzymatique de MMPs. Enfin, ces deux médiateurs augmentent aussi la migration des AoSMCs, de manière dépendante de l'activité de la MMP2.

Les résultats indiquent que la modulation de l'activation du récepteur TP est une cible thérapeutique pour retarder ou empêcher le développement de l'athérosclérose. Dans ce mémoire, les effets de deux antagonistes du récepteur TP (le BM-520 et le SQ29548) ont également été étudiés. Ces deux antagonistes diminuent les différents effets des agonistes observés dans notre étude.

L'ensemble de ces résultats indique que les antagonistes du récepteur TP pourraient inhiber la progression de l'athérogénèse et ainsi induire un effet bénéfique chez les patients atteints d'athérosclérose.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire
Janvier 2011

Promoteur : J.-M. Dogné

Co-Promoteur : C. Michiels

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont de près ou de loin contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à mes promoteurs, Monsieur Jean-Michel Dogné et Madame Carine Michiels qui m'ont permis de réaliser ce mémoire. Merci à Jean-Michel Dogné pour son regard critique et la confiance qu'il m'a accordé pour ce mémoire. Merci à Carine Michiels pour son accueil au sein de l'équipe « HIF », son encadrement, son enthousiasme, sa disponibilité, ses nombreux encouragements et le temps qu'elle m'a consacré.

Je remercie également Stéphanie Rolin pour son dynamisme, sa disponibilité, son optimisme et ses encouragements lorsque j'avais besoin de ses conseils.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du département de Pharmacie et du laboratoire URBC pour leur accueil chaleureux et surtout à l'équipe « HIF » pour leur aide. Je tiens entre autre à remercier Martine Van Steenbrugge et Edouard Delaive pour leurs conseils et surtout leur aide.

Merci aux mémorants d'URBC pour les moments chaleureux de travail et de détente passés ensemble.

Un tout grand merci à ma famille qui m'a soutenue durant cette période et qui a toujours cru en moi.

Abréviations

ADNc	ADN complémentaire
AoSMC	Normal Human Aortic Smooth Muscle Cell
Apo	Apolipoprotéine
ARNm	ARN messenger
CETP	<i>Cholesterol Ester Transfert Protein</i>
COX	Cyclooxygénase
DAG	Diacylglycérol
ECM	Matrice extracellulaire
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule</i>
IDL	<i>Intermediate Density Lipoprotein</i>
IL-1 β	Interleukine-1 bêta
IL-6	Interleukine-6
IL-18	Interleukine-18
LCAT	<i>Lecithin Cholesterol Acyl Transferase</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LPL	<i>Lipoprotein Lipase</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MMP	Métalloprotéinase
MT-MMP	Métalloprotéinase de type membranaire
PKC	Protéine Kinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SIN-1	3-morpholinosydmine N-ethylcarbamide
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TIMP	Inhibiteur de Métalloprotéinase Matricielle
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor- α</i>

TXA ₂	Thromboxane A ₂
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
8-iso-PGF _{2α}	8-iso-prostaglandine F _{2α}

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION.....	1
1. Athérosclérose.....	1
1.1 Facteurs de risque.....	1
1.2 Lipoprotéines.....	2
1.2.1 Structure des lipoprotéines.....	2
1.2.2 Apoprotéines.....	3
1.2.3 Métabolisme des lipoprotéines.....	4
1.2.3.1 Les chylomicrons.....	4
1.2.3.2 Les VLDL et les LDL.....	4
1.2.3.3 Les HDL.....	5
1.2.4 Pathologies associées au métabolisme des lipoprotéines.....	5
1.3 Physiopathologie de l'athérosclérose.....	5
1.3.1 Structure d'une artère saine.....	6
1.3.2 La lésion pré-athéromateuse.....	6
1.3.3 Les stries lipidiques.....	7
1.3.4 La plaque athéromateuse fibro-lipidique.....	7
1.3.5 La plaque athéromateuse compliquée.....	7
1.4 Athérogenèse.....	7
1.4.1 Initiation de la lésion.....	8
1.4.2 Recrutement des leucocytes.....	9
1.4.3 Formation des cellules spumeuses et du centre nécrotique.....	9
1.4.4 Migration des cellules musculaires lisses.....	10
1.4.5 Rupture de la plaque et formation d'un thrombus.....	11
2. Métalloprotéinases (MMPs).....	11
2.1 Structure des MMPs.....	11
2.2 Différentes MMPs.....	12
2.3 Activation et inhibition des MMPs.....	12
2.4 Implication des MMPs dans l'athérosclérose.....	13
3. Médiateurs issus de l'acide arachidonique.....	13
3.1 Thromboxane A ₂	14
3.1.1 Métabolisme de l'acide arachidonique (voie enzymatique).....	14
3.1.2 Cyclooxygénases.....	14
3.1.3 Rôle du thromboxane A ₂	15
3.2 Isoprostanes.....	15
3.2.1 Métabolisme de l'acide arachidonique (voie non enzymatique).....	15
3.2.2 Rôle du 8-iso-PGF _{2α}	16

3.3 Récepteur TP.....	16
3.3.1 Distribution du récepteur.....	16
3.3.2 Structure et isoforme du récepteur TP.....	16
3.3.3 Transduction du signal.....	17
3.4 Implication du TXA ₂ et de l'isoprostane dans l'athérosclérose.....	17
3.5 Modulation de la transduction du signal du récepteur TP.....	18

4. Objectif du mémoire..... 19

II.MATERIEL ET METHODES..... 20

1. Culture cellulaire..... 20

1.1 Matériel.....	20
1.2 Méthode.....	20

2. Stimulation des cellules..... 21

2.1 Molécules utilisées.....	21
2.2 Méthode.....	21

3. Mesure de l'expression de gènes par RT-PCR en temps réel..... 22

3.1 Extraction de l'ARN total.....	22
3.1.1 Matériel.....	22
3.1.2 Méthode.....	22
3.2 Rétro-transcription.....	22
3.2.1 Matériel.....	22
3.2.2 Méthode.....	23
3.3 PCR en temps réel.....	23
3.3.1 Matériel.....	23
3.3.2 Méthode.....	23

4. Mesure de l'activité des métalloprotéinases : zymogramme..... 24

4.1 Matériel.....	24
4.2 Méthode.....	24
4.2.1 Préparation des gels.....	24
4.2.2 Préparation des échantillons et migration.....	24
4.2.3 Traitement du gel.....	24
4.2.4 Révélation.....	25

5. Test de prolifération cellulaire : dosage MTT 25

5.1 Matériel.....	25
5.2 Méthode.....	25

6. dosage de la concentration des protéines par la méthode de Folin 25

6.1 Matériel.....	26
6.2 Méthode.....	26

7. Scratch test.....	26
7.1 Matériel.....	26
7.2 Méthode.....	26
8. Extraction des protéines membranaires pour Western Blot.....	27
8.1 Matériel.....	27
8.2 Méthode.....	27
9. Dosage de la concentration en protéine par la méthode de Pierce.	27
9.1 Matériel.....	27
9.2 Méthode.....	27
10. Western Blot.....	28
10.1 Matériel.....	28
10.2 Méthode.....	28
10.2.1 Préparation des gels.....	28
10.2.2 Préparation des échantillons et migration.....	29
10.2.3 Transfert sur membrane.....	29
A/ Pour Licor.....	29
10.2.4 Traitement de la membrane.....	29
10.2.5 Révélation.....	29
B/ Pour Western Chemoluminescence.....	29
10.2.4 Traitement de la membrane.....	29
10.2.5 Révélation.....	30
11. Filtration de la BSA.....	30
11.1 Matériel.....	30
12. Coloration des protéines présentes dans le gel.....	30
12.1 Matériel.....	30
12.2 Méthode.....	30
III. RESULTATS.....	31
1. Caractérisation des effets des agonistes du récepteur TP sur la production de MMPs par les AoSMCs.....	31
1.1 Effets des agonistes sur l'abondance de l'ARNm de gènes impliqués dans la production MMPs.....	31
1.2 Mesure de l'activité enzymatique des MMPs.....	33
1.2.1 Identification des enzymes révélées par zymographie.....	33
1.2.2 Effets des agonistes du récepteur TP sur l'activité enzymatique des MMPs...	34
2. Effets des agonistes et des antagonistes du récepteur TP sur la prolifération cellulaire.....	35

3. Effets des agonistes du récepteur TP sur la migration des AoSMCs.....	36
3.1 Effet des agonistes et des antagonistes du récepteur TP sur la migration des AoSMCs.....	36
3.2 Effets des inhibiteurs des MMPs sur la migration des AoSMCs.....	37
4. Effets des agonistes du récepteur TP sur l'induction d'un phénotype inflammatoire dans les AoSMCs.....	37
4.1 Effets des agonistes du récepteur TP sur l'abondance de l'ARNm de gènes impliqués dans l'inflammation.....	37
4.2 Effet des agonistes du récepteur TP sur l'abondance protéique d'ICAM-1.....	38
IV. DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	39
V. BIBLIOGRAPHIE.....	45

I. Introduction

I. Introduction

1. Athérosclérose

Les maladies cardiaques telles que l'athérosclérose sont une des principales causes d'infarctus du myocarde et de mort dans les pays industrialisés. Cette maladie, très prévalente dans notre société, est en nette progression dans les pays en voie de développement (Glass and Witztum 2001) (Libby 2002) (Lusis 2000). Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) cette maladie est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyens calibres résultant de l'accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de cellules du sang, de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaire, le tout conduisant à un changement de la structure de l'intima et de la média.

L'athérosclérose peut être considérée comme une forme d'inflammation chronique aboutissant au développement de lésions. L'évolution de ces lésions est un processus lent et progressif qui aboutit à la formation d'une plaque athéromateuse qui entrave la circulation du sang. Une des premières lésions formées est l'accumulation sous endothéliale de macrophages gorgés de cholestérol et de lipides. Cette lésion déclenche une série de processus complexes qui conduisent au recrutement de cellules inflammatoires et à la formation de la plaque athéromateuse. C'est à partir de ce moment que commencent à apparaître les premiers symptômes (Lusis 2000).

1.1 Facteurs de risque

L'athérosclérose est une maladie multifactorielle. De nombreuses études épidémiologiques ont identifié différents facteurs de risque d'origine génétique et/ou d'origine environnementale (Lusis 2000).

Le facteur environnemental majeur semble être une alimentation riche en lipides. En effet, selon les expérimentations réalisées sur des animaux, il existerait une relation entre un apport excessif en cholestérol et en triglycérides et le développement de l'athérosclérose. De plus, d'autres facteurs tels que la cigarette, le diabète et l'obésité peuvent provoquer le développement de l'athérosclérose. Selon une étude, 30% des décès cardiaques seraient dus à la cigarette (Peto, Lopez et al. 1992). En ce qui concerne l'obésité, un excès de graisse intra-abdominale ou truncal serait un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires et aurait une influence sur la lipidémie, la pression sanguine et la tolérance au glucose. Enfin, un manque d'exercice physique peut aussi contribuer au développement de l'athérosclérose.

Les facteurs génétiques rassemblent l'ensemble des dyslipidémies, maladies conduisant à une augmentation du taux de LDL (*Low Density Lipoprotein*) et à une diminution de HDL (*High Density Lipoprotein*). Un taux élevé d'homocystéine dans le sang semble également intervenir dans le développement de l'athérosclérose. L'action de cet acide aminé est d'endommager directement les cellules endothéliales en interférant avec la coagulation et en oxydant les LDL. L'hypertension artérielle semble aussi être un facteur génétique qui

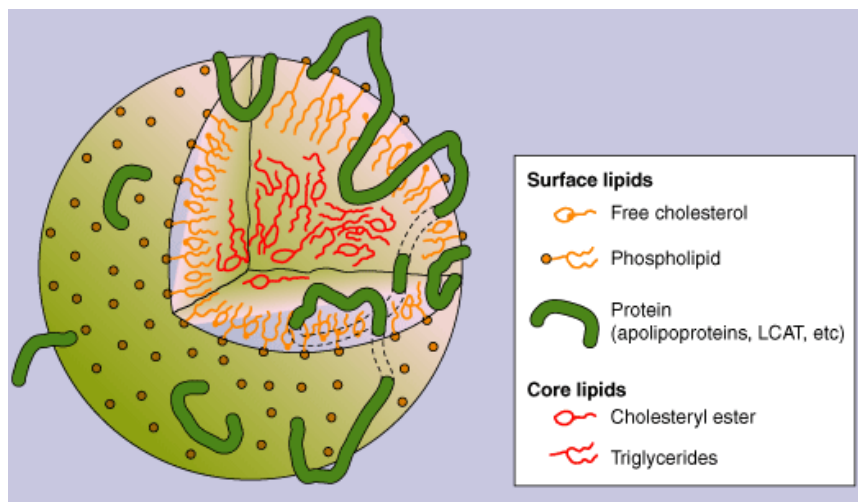


Figure I.1 : Structure d'une lipoprotéine

Le cœur d'une lipoprotéine est majoritairement composé de triglycérides et de cholestérol estérifiés. En surface, ces lipides insolubles sont entourés de phospholipides, de cholestérol et d'apoprotéines (http://www.cmglinks.com/asa/lectures/Part_2/lecture/1.htm).

aboutirait au développement de l'athérosclérose. Ce facteur de risque doit absolument être traité et pourrait être en relation avec un autre facteur de risque thrombogénique et lipidique.

En plus, des facteurs de risque d'origine environnementale et d'origine génétique, d'autres facteurs de risques non modifiables tels que le sexe, l'âge et la race semblent influencer le développement de l'athérosclérose. Chez l'homme, les complications cliniques apparaissent vers l'âge de 50 ans tandis que pour la femme, ils apparaissent plus tardivement, ceci serait dû à la présence d'hormones telles que les œstrogènes (Assmann, Cullen et al. 1999).

1.2 Lipoprotéines

Le cholestérol, molécule hydrophobe et insoluble dans les milieux biologiques aqueux, ne peut circuler de manière libre dans la circulation sanguine. Dès lors, il est transporté en plusieurs petites unités : les lipoprotéines. Ces lipoprotéines ont comme fonction d'assurer le transport et la distribution des lipides endogènes (provenant d'une synthèse de *novo*) et exogènes (provenant de l'alimentation) et des substances liposolubles entre les différents tissus impliqués dans le métabolisme (Schaefer and Levy 1985).

1.2.1 Structure des lipoprotéines

La majorité des lipoprotéines ont une structure sphérique constituée de deux composants : une partie centrale plus ou moins volumineuse et une couche périphérique qui l'entoure. Le noyau central, composante hydrophobe, est constitué de lipides apolaires (triglycéride et cholestérol estérifié), strictement insolubles dans l'eau. La couche périphérique est composée de lipides polaires assemblés en une monocouche de phospholipides où des molécules de cholestérol non estérifiées et des apolipoprotéines se sont insérées (**Figure I.1**). La cohésion interne de l'édifice lipoprotéinique n'est possible que grâce aux liaisons hydrophobes entre les chaînes aliphatiques des acides gras des lipides et les chaînes aliphatiques des acides aminés apolaires des protéines ainsi que grâce aux liaisons ioniques entre les groupes polaires des régions hélicoïdales des apoprotéines et des phospholipides adjacents (Chapman 1982; Schaefer and Levy 1985).

Les apoprotéines sont considérées comme la base du classement des lipoprotéines. Les différentes familles de lipoprotéines plasmiqes ont toutes en commun une même structure mais diffèrent entre elles au niveau de leur métabolisme et de leur rôle physiologique.

Les lipoprotéines sont classées et nommées en fonction :

- De la charge électrique : la charge électrique des lipoprotéines est variable selon la composition protéique
- La densité hydratée : la densité hydratée des lipoprotéines varie principalement avec leur richesse relative en lipide.

Les lipoprotéines de plus faible densité sont les chylomicrons. Les VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), les LDL (*Low Density Lipoprotein*) et le HDL (*High Density Lipoprotein*) sont

des lipoprotéines respectivement de plus en plus denses. Plus le complexe est chargé en apoprotéines et plus la densité est élevée. De plus, la taille des lipoprotéines est inversement proportionnelle à la densité. De ce fait, les chylomicrons sont les plus grosses particules, les plus riches en triglycérides et en cholestérol et les plus pauvres en protéines alors que les HDL sont les plus petites particules et les plus riches en apoprotéines.

1.2.2 Apoprotéines

Les apoprotéines interviennent dans le devenir des lipoprotéines par la fonction de ligands pour leur récepteur et par la fonction de cofacteur pour certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides. Les apolipoprotéines sont formées principalement dans le foie mais aussi dans l'intestin. Il existe une grande variété d'apolipoprotéines :

- Apolipoprotéine A-I : ou encore appelée Apo-I, elle est le principal composant des HDL. Elle est synthétisée par la muqueuse de l'intestin grêle et est incorporée dans les chylomicrons. Elle sera incorporée par après dans les HDL. L'apo A-I participe à l'activation de LCAT (*lecithin-cholesterol acyl transferase*), qui estérifie le cholestérol et permet la mise en réserve de celui-ci (Olofsson, Wiklund et al. 2007).
- Apolipoprotéine B :
 - Apo B-48 : se trouve principalement dans les chylomicrons intestinaux et est synthétisée dans la muqueuse intestinale. Suite à l'introduction d'un codon stop traductionnel après 48% de la séquence codante, l'ARNm de l'apoprotéine est différent de celui encodant l'Apo B-100 (Hinsdale, Sullivan et al. 2002).
 - Apo B-100 : est la principale apoprotéine des LDL. Elle est synthétisée dans le foie et entre dans le plasma avec les VLDL. Dans chaque particule de LDL, une molécule Apo B-100 est présente (Olofsson, Wiklund et al. 2007).
- Apolipoprotéine C-II : est présente dans les chylomicrons, les VLDL et les HDL. Apo C-II est un cofacteur requis pour permettre l'activation de la LPL (*Lipoprotein lipase*). Cette dernière hydrolyse les triglycérides des chylomicrons et des VLDL (Goldberg, Scheraldi et al. 1990).
- Apolipoprotéine E : est un composant des chylomicrons, des VLDL et des HDL. L'Apo E se lie avec une grande affinité aux récepteurs des LDL mais aussi aux autres membres de la famille des LDL-récepteurs, ce qui facilite la capture de particules lipoprotéines par les cellules (Kockx, Jessup et al. 2008).

1.2.3 Métabolisme des lipoprotéines

Le métabolisme des lipoprotéines est un processus complexe faisant appel à de nombreuses réactions qui contrôlent la synthèse des lipides et des apoprotéines, l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines, le catabolisme de ces lipoprotéines dans la circulation et l'utilisation par les tissus (Chapman 1982) (Rouffy, Chanu et al. 1983).

1.2.3.1 Les chylomicrons

Les chylomicrons sont formés dans les entérocytes grâce à un assemblage de triglycérides, de cholestérol provenant de l'alimentation et d'apolipoprotéines. Les chylomicrons excrétés sont dits natifs car ces derniers n'ont pas d'apoprotéine B-48. Lorsqu'ils arrivent dans le plasma, via une voie lymphatique, les chylomicrons natifs vont subir une maturation. Ce processus se fait grâce à l'adjonction d'autres apolipoprotéines comme les Apo E et C provenant des HDL circulants. Le complexe Apo B-48 et Apo E est nécessaire pour permettre la reconnaissance des chylomicrons par les récepteurs exprimés par les cellules du foie. Les apolipoprotéines C (dont l'apo C-II) interviennent dans l'activation de la lipoprotéine lipase, présente à la surface des capillaires alimentant les tissus, qui hydrolyse les triglycérides des chylomicrons. Dès que les chylomicrons sont dans la circulation sanguine, ils sont transportés vers les tissus périphériques ou utilisateurs tels que le tissu adipeux, les muscles striés, le muscle cardiaque et sont absorbés par ceux-ci. Les acides gras issus de l'hydrolyse enzymatique des triglycérides sont utilisés par les cellules alors que le glycérol est quant à lui renvoyé dans la circulation. Les chylomicrons dépourvus de triglycérides perdent petit à petit des apoprotéines et des phospholipides qui sont transférés aux HDL. Cette perte de constituants aboutit à la formation de remnants de chylomicrons. Ces derniers sont ensuite enlevés de la circulation grâce à des récepteurs hépatiques qui reconnaissent le complexe Apo B-48-E. Après une entrée par endocytose, les remnants de chylomicrons sont hydrolysés par les lysosomes et libèrent du cholestérol et des acides aminés provenant des apoprotéines (Illingworth 1993).

1.2.3.2 Les VLDL et les LDL

La synthèse des lipoprotéines à faible densité (VLDL) se fait dans le foie, sous forme native c'est-à-dire à partir de triglycérides endogènes, le principal constituant, et d'apoprotéines dont l'Apo B-100 et de l'Apo A-I. Les VLDL sont tout d'abord excrétées par exocytose dans le sang dans le but d'apporter des triglycérides aux tissus périphériques. La synthèse des VLDL est réalisée de manière continue par les hépatocytes. Ceci permet d'avoir une sécrétion permanente de triglycérides. Dès que les VLDL naissantes se trouvent dans la circulation sanguine, elles reçoivent des apoprotéines C-II et E des HDL comme les chylomicrons. Dans la circulation, les VLDL sont dégradées plus lentement que les chylomicrons et de ce fait, elles perdent petit à petit les triglycérides. Parallèlement, des échanges entre ces triglycérides et les HDL ont lieu grâce à l'action de la CETP (*Cholesterol Ester Transfert Protein*). Les VLDL s'enrichissent en ester de cholestérol alors que les HDL récupèrent les apoprotéines C et E. On aboutit donc à la formation de lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), des remnants des VLDL plus petits, proportionnellement enrichis en cholestérol estérifié et en Apo B-100 et E. Une partie des IDL est éliminée du plasma par voie des récepteurs

hépatiques alors que les restants poursuivent leur catabolisme dans la circulation où ils seront transformés en LDL via l'action de la lipase hépatique. Les LDL sont reconnues par les récepteurs de surface des cellules grâce à l'Apo B-100. Les complexes récepteur-ligand ainsi formés permettent l'endocytose des particules. Les triglycérides et les phospholipides sont hydrolysés en acide gras tandis que les esters de cholestérol sont hydrolysés en cholestérol libre. Les nouvelles molécules ainsi formées peuvent être réutilisées pour les besoins de la cellule (Chapman 1982).

1.2.3.3 Les HDL

Les HDL sont synthétisées dans le foie et excrétées par exocytose dans la circulation sanguine. Les HDL sont principalement constituées d'apoprotéines et de phospholipides dont les phosphatidylcholines. Suite à l'action de la LCAT, dont l'action dépend de l'Apo A-I, les HDL s'enrichissent en esters de cholestérol. La CETP permet aussi le transfert du cholestérol aux autres lipoprotéines (Nestel 1987).

1.2.4 Pathologies associées au métabolisme des lipoprotéines

Un dysfonctionnement du métabolisme des lipoprotéines peut avoir lieu à différents niveaux tels que des défauts de synthèse de récepteurs des apoprotéines, des défauts de synthèse ou d'inactivation des enzymes intervenant dans le métabolisme des lipoprotéines.

L'absence ou l'inactivation de la lipoprotéine lipase comme celle de l'Apo C-II, toutes deux activatrices de la lipoprotéine lipase, induit une accumulation exagérée de triglycérides suite à la non consommation des chylomicrons. Cette maladie est appelée l'hyperchylomicronémie ou hyperlipidémie de type I. De plus, un défaut dans la production de récepteur spécifique des LDL induit une accumulation des LDL plasmatiques et de cholestérol libre et est appelé hypercholestérolémie ou hyperlipidémie de type II.

Différentes maladies liées à un dysfonctionnement des métabolismes des lipoprotéines comme l'hyperlipidémie peuvent être responsables de maladies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose.

1.3 Physiopathologie de l'athérosclérose

L'athérosclérose prend en compte deux termes : « athérome » et « sclérose ». Le terme « athérome » provient du grec « ather » signifiant « bouillie », ce qui désigne une portion molle et riche en lipides. Par la suite, ce cœur lipidique se recouvre d'une chape fibreuse d'où le nom « sclérose ». Ces deux composants, lipides et fibres, constituent la plaque athéromateuse. L'athérosclérose est actuellement connue comme une association variable de différents changements de l'intima de certaines artères due à l'accumulation focale de lipides, de cellules du sang, de tissu fibreux et de dépôt calcique (Libby 2002) (Lusis 2000).

L'athérosclérose, maladie progressive associée à une inflammation vasculaire chronique et à un stress oxydatif, passe par différentes étapes de façon progressive : la lésion pré-

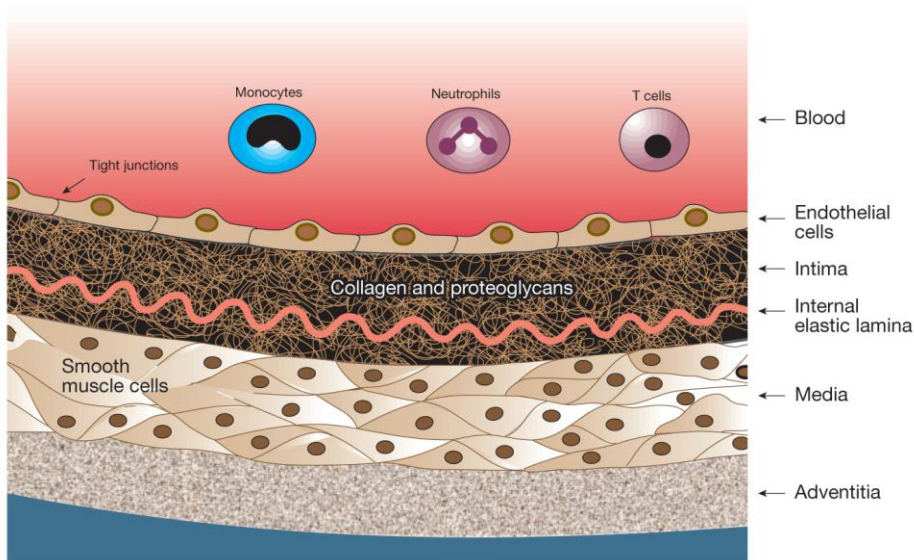


Figure I.2 : Structure d'une artère saine

Les artères sont constituées de trois couches distinctes. L'intima, en contact avec le flux sanguin, est majoritairement constituée de cellules endothéliales. La média, couche intermédiaire, est constituée de cellules musculaires lisses. L'adventice, la couche externe, est composée de tissu conjonctif contenant des fibroblastes et une matrice extracellulaire abondante (Lusis 2000).

athéromateuse, la strie lipidique, la plaque athéromateuse fibro-lipidique et la plaque athéromateuse compliquée (Libby 2002) (Glass and Witztum 2001) (Lusis 2000).

1.3.1 Structure d'une artère saine

Le système artériel a pour but de transporter du sang oxygéné vers les différents tissus de l'organisme. Ce système est très étendu et se termine par des réseaux de fins capillaires où les échanges de métabolites et de gaz entre le sang et les tissus peuvent avoir lieu.

Les artères les plus touchées par l'athérosclérose sont l'aorte, les artères coronaires, les artères cérébrales et enfin les artères des membres inférieurs. Toutes ces artères possèdent une structure commune composée de trois couches distinctes : l'intima, la média et l'adventice (**Figure I.2**).

L'intima est la couche la plus interne. Elle est composée d'une monocouche de cellules épithéliales aplaties et jointives selon la direction du flux sanguin. Ces cellules, appelées cellules endothéliales, forment l'endothélium. Celles-ci reposent sur une lame basale, sous laquelle une mince couche de fibres de collagène et de fibres élastiques est présente. L'endothélium assure de nombreuses fonctions dont celle de former une barrière physique entre le sang et les tissus (Libby 2002). Suite à des modifications chimiques, physiques, et humorales, l'endothélium est capable de réagir en synthétisant ou libérant différents facteurs qui modulent la coagulation, l'angiogenèse, la réponse inflammatoire, l'homéostasie et la perméabilité vasculaire. Un équilibre entre la vasodilatation, la vasoconstriction, l'inhibition ou la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses, la prévention et la stimulation de l'agrégation plaquettaire est maintenu au sein de l'endothélium (Feletou and Vanhoutte 2006).

La média, la couche séparée de l'intima par la lame élastique interne et de l'adventice par la lame élastique externe, est majoritairement composée de cellules musculaires lisses mais aussi de constituants extracellulaires (Libby 2002) (Lusis 2000).

L'adventice, la couche la plus externe, est constituée de tissu conjonctif (collagène et élastine) et de tissu adipeux. Dans les artères à paroi épaisse, l'adventice possède de petits vaisseaux, les *vaso vasorum*, dont le rôle est d'irriguer la paroi artérielle (Libby 2002) (Lusis 2000).

1.3.2 La lésion pré-athéromateuse

La lésion initiale est induite par l'accumulation sous-endothéliale de macrophages gorgés de lipides (cellules spumeuses). Ce dépôt commence dès l'enfance. Il existe aussi un début de prolifération des cellules musculaires lisses dans l'intima, cependant ces modifications n'ont pas de conséquence, à ce stade, sur la morphologie de la lumière vasculaire. Un remodelage adaptatif du vaisseau se fait en réponse à l'athérosclérose : le diamètre externe du vaisseau augmente de manière à conserver un calibre luminal normal (Lusis 2000) (**Figure I.3**).

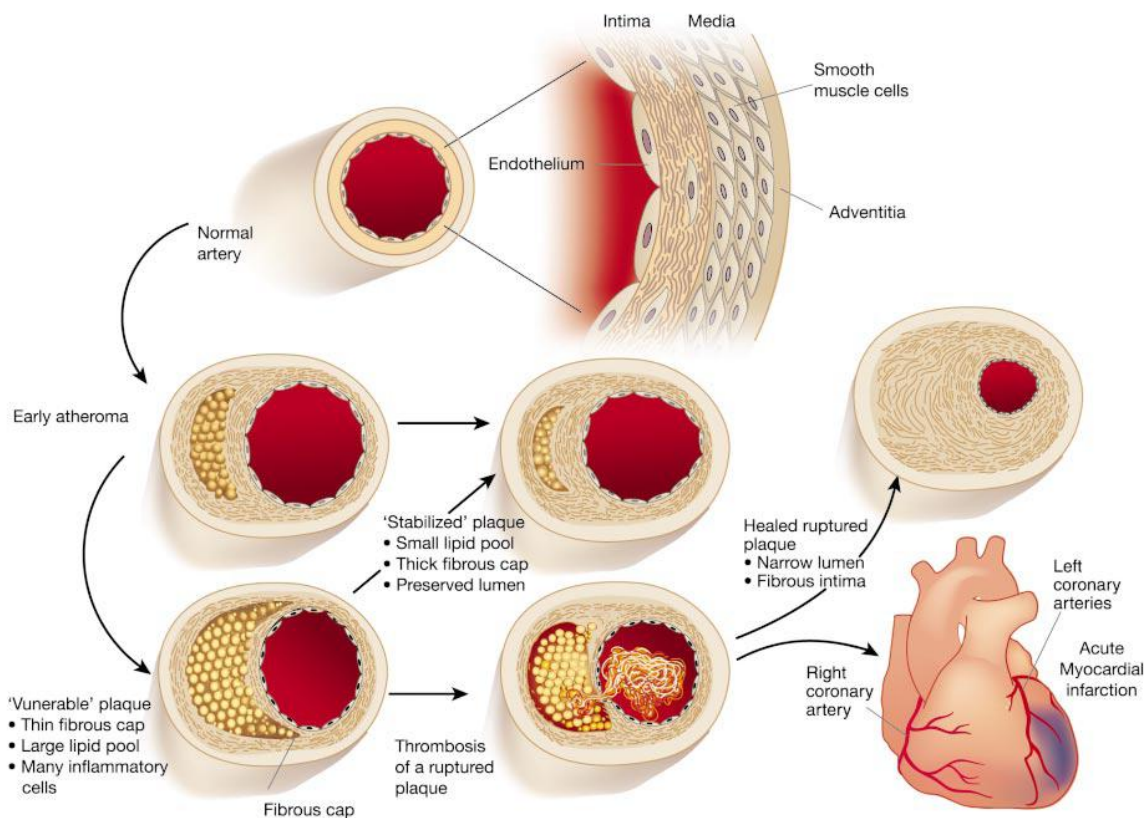


Figure I.3 : Evolution d'une plaque athéromateuse

La lésion se forme de manière progressive et commence par l'accumulation de monocytes qui se différencient en macrophages gorgés de lipides appelés cellules spumeuses. Ce stade constitue le stade de la strie lipidique. Ensuite, la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima et leur prolifération constituent une étape clé dans le processus d'athérogenèse. Ces cellules vont par après former la chape fibreuse tandis que les débris cellulaires, le cholestérol et les autres cellules vont former le cœur nécrotique. Ceci correspond au stade de la plaque fibro-lipidique. L'évolution de la lésion est fonction de la composition cellulaire de la plaque. Une chape fibreuse épaisse permet de stabiliser la plaque tandis qu'une fine chape fibreuse déstabilise la plaque et des complications comme la rupture de la plaque ou/et la formation d'un thrombus peuvent apparaître (Libby 2002).

1.3.3 Les stries lipidiques

Les stries lipidiques sont comme des traînées jaunâtres déformant légèrement la paroi artérielle. Elles sont visibles au niveau de l'aorte chez les jeunes enfants, mais aussi au niveau des artères coronaires vers l'âge de dix ans. Ces stries lipidiques se trouvent essentiellement au niveau de l'intima. Cependant, il existe certains sites de prédilection de la formation des stries lipidiques en fonction du flux sanguin. Les régions ayant un flux sanguin turbulent ont plus de chance de voir apparaître des stries lipidiques. Ces dernières, considérées comme des précurseurs de la plaque athéromateuse, peuvent évoluer vers le stade suivant ou régresser. Ceci dépend des forces hémodynamiques exercées sur les cellules endothéliales et du taux plasmatique en lipoprotéines athérogènes (Lusis 2000).

1.3.4 La plaque athéromateuse fibro-lipidique

La plaque athéromateuse fibro-lipidique ou simple consiste en une élévation régulière de l'endothélium, correspondant à un épaississement de l'intima. Cet épaississement est constitué d'une chape fibreuse et d'un corps nécrotique. La chape fibreuse composée de cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire entoure un corps nécrotique riche en lipides. Dans les plaques simples, la partie fibreuse est majoritairement prédominante. La croissance de la plaque entraîne des modifications de la paroi artérielle dont une réduction du calibre de la lumière artérielle (Lusis 2000) (**Figure I.3**).

1.3.5 La plaque athéromateuse compliquée

Le processus de formation de la plaque peut évoluer vers une lésion beaucoup plus complexe qui s'étendra longitudinalement puis sur toute la circonférence du vaisseau. Ce processus est dû à une multiplication des cellules musculaires lisses qui s'accumulent dans la plaque et au dépôt d'une abondante matrice extracellulaire (**Figure I.3**). A ce stade là, différentes manifestations cliniques sont visibles :

- L'apparition d'une néo-vascularisation et d'une calcification, caractéristiques des lésions avancées, affectent la stabilité de la plaque. La formation de nouveaux vaisseaux, particulièrement fragiles, mène à des microhémorragies dans la plaque, ce qui constitue une voie d'entrée pour les cellules inflammatoires.
- La rupture de la plaque peut entraîner une ulcération. Cette dernière amène à une interaction entre le sang circulant et les constituants de la plaque. Ce contact induit la formation d'un thrombus qui obstrue la lumière de l'artère et peut provoquer un infarctus du myocarde. L'ulcération peut aussi être une source d'embolies suite à la libération de matériel athéromateux ou de cristaux de cholestérol dans la circulation (Libby 2002) (Lusis 2000).

1.4 Athérogenèse

Une série de changements dans les vaisseaux et la participation des cellules inflammatoires

dont les monocytes et les macrophages jouent un rôle clé dans le développement de l'athérosclérose. L'endothélium joue aussi un rôle crucial dans l'initiation et la progression des plaques athéromateuses. Très rapidement, les fonctions de l'endothélium vont être altérées sans pour autant que les lésions artérielles ne soient cliniquement détectables (Lusis 2000).

1.4.1 Initiation de la lésion

Les lésions athéromateuses sont des processus lents et progressifs. Ses lésions se développent principalement dans des régions de bifurcation et les courbures des artères. En effet, ces régions ont un flux sanguin irrégulier et des forces de cisaillement ayant des variations temporelles et spatiales. De ce fait, la morphologie et l'orientation des cellules de l'endothélium, qui sont normalement allongées et alignées dans la direction du flux uniforme et laminaire, sont modifiées. Le haut taux de renouvellement cellulaire et la fragilité des jonctions intercellulaires conduit à une perméabilité accrue aux macromolécules telles que les LDL mais aussi aux cellules du sang. Celles-ci adhèrent localement à cet endothélium et s'infiltrant dans la paroi artérielle (Gimbrone 1999).

L'accumulation des LDL dans la matrice sous-endothéliale est en relation avec le taux élevé de LDL circulants. Dès que celles-ci sont passées via les jonctions des cellules endothéliales, les LDL sont retenues dans la paroi artérielle. Cette rétention sous-endothéliale est due à la matrice extracellulaire et notamment aux protéoglycans. Les charges positives des résidus des Apo B-100 des LDL interagissent avec les charges négatives des glycosaminoglycans (Boren, Olin et al. 1998).

Les LDL séquestrées subissent des modifications progressives telles que l'oxydation, la lipolyse, la protéolyse et l'aggrégation, ce qui aboutit à une réponse inflammatoire localisée aussi bien qu'à la formation des cellules spumeuses (Lusis 2000).

Une des premières modifications des LDL est l'oxydation des lipides suite à une exposition avec des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS peuvent-être produits par différents types cellulaires tels que les monocytes, les macrophages, les granulocytes, les lymphocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Les ROS s'attaquent aux acides gras polyinsaturés, plus fragiles du fait de leur double liaison. Ces modifications aboutissent tout d'abord à la formation de « *minimally oxidized LDL* ». Ces complexes, ayant une activité pro-inflammatoire, ne sont pas reconnus par les récepteurs scavengers, récepteurs reconnaissant les LDL modifiées, exprimés par les macrophages et les cellules musculaires lisses. Les acides gras polyinsaturés présents dans les LDL sont tout d'abord convertis en hydroperoxydes via un processus oxydatif puis sont clivés pour former des produits caractérisés par des fonctions aldéhydes réactives. Ceux-ci modifient l'Apo B-100 des LDL masquant leurs charges positives, ce qui permet une reconnaissance avec les récepteurs scavengers. Les « *minimally oxidized LDL* » activent l'endothélium et il s'en suit une augmentation de l'expression de molécules pro-inflammatoires incluant les molécules d'adhérence comme VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) et ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule*) et des facteurs de croissance comme M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating factor*) par les cellules endothéliales (Lusis 2000) (Reape and Groot 1999).

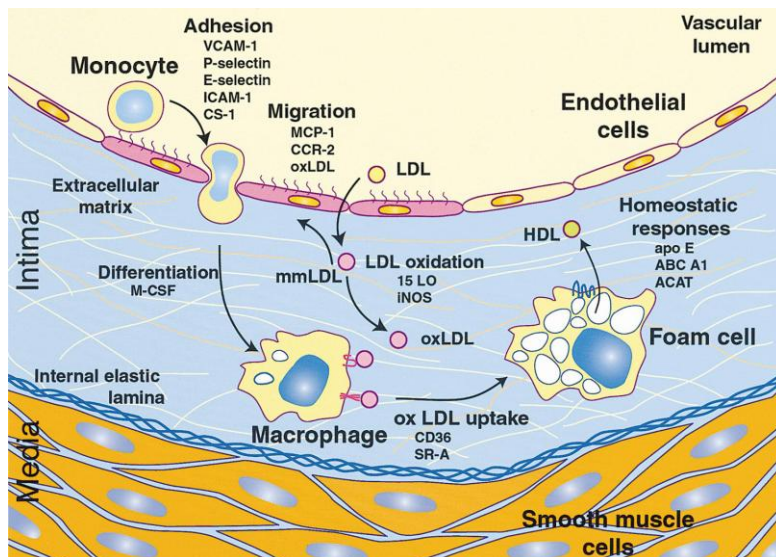


Figure I.4 : Initiation de la lésion et formation des cellules spumeuses

Les molécules d'adhérence comme VCAM-1 et ICAM-1 sont surexprimées par l'endothélium. Cette expression permet l'adhérence puis la transmigration des leucocytes. La migration des monocytes est aussi médiée via l'expression de MCP-1. Dès que les macrophages sont dans l'intima, une partie de ceux-ci vont se charger de LDL oxydés, ce qui aboutit à la formation de cellules spumeuses (Glass and Witztum 2001).

D'autre part, des enzymes comme la phospholipase A₂, la myéloperoxydase et la sphingomyélinase peuvent aussi modifier les LDL. La phospholipase A₂ interviendrait dans l'oxydation des LDL, la myéloperoxydase générerait des espèces hautement réactives et la sphingomyélinase favoriserait l'agrégation des LDL (Lusis 2000).

1.4.2 Recrutement des leucocytes

Le recrutement des leucocytes dans la paroi artérielle (**Figure I.4**) est une des premières étapes aboutissant à la formation des stries lipidiques. Les « *minimally oxidized LDL* », activant l'endothélium, sont à l'origine de l'accumulation des leucocytes au niveau de la plaque athéromateuse.

Dès que l'endothélium est activé, des molécules pro-inflammatoires comme des molécules d'adhérence, des facteurs de croissance ou des chémokines sont produites. Les LDL oxydées peuvent aussi inhiber la production d'oxyde nitrite (NO) (Libby 2002) (Glass and Witztum 2001) (Reape and Groot 1999).

Les molécules d'adhérence, molécules permettant des interactions leucocyte-leucocyte, leucocyte-endothélium, leucocyte-cellule musculaire lisse et leucocyte-matrice extracellulaire, appartiennent à quatre familles : les sélectines, les ligands de sélectine, les intégrines et les membres de la famille des immunoglobines. La P-sélectine, exprimée par les cellules endothéliales et les plaquettes après stimulation, la E-sélectine, exprimée suite à l'activation de l'endothélium, la L-sélectine, constitutivement exprimée par les leucocytes, et les ligands des sélectines permettent le rolling des leucocytes. L'adhérence des leucocytes et la transmigration de ceux-ci se fait via des intégrines et des membres de la famille de l'immunoglobuline comme ICAM-1 et VCAM-1 (Huo and Ley 2001).

La migration des monocytes à travers la paroi artérielle est aussi stimulée par diverses chémokines. Les LDL oxydées induisent l'expression de molécules telles que MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) par les cellules endothéliales. L'expression de MCP-1 par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, suite à une hypercholestéromie, pourrait être responsable d'un influx initial des monocytes au niveau de la paroi artérielle. De nombreuses données suggèrent que MCP-1 interviendrait dans l'infiltration continue de monocytes. Les monocytes exprimant le récepteur pour MCP-1, CCR2, remontent le gradient de chémokines pour arriver au niveau de la lésion. Une délétion du gène MCP-1 ou de celui encodant CCR2 réduit fortement le développement de lésion athéromateuse chez les souris Apo E déficientes (Glass and Witztum 2001) (Reape and Groot 1999). La cytokine M-CSF intervient dans la différenciation des monocytes en macrophages, leur prolifération et influence différentes fonctions des macrophages comme l'expression des récepteurs scavengers (Lusis 2000).

1.4.3 Formation des cellules spumeuses et du centre nécrotique

Les LDL oxydées reconnues par les récepteurs scavengers induisent leur internalisation par

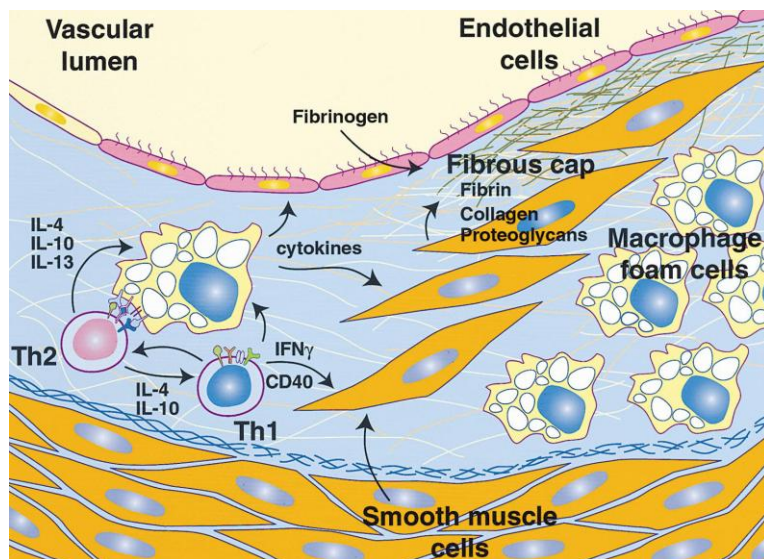


Figure I.5 : Progression de la lésion

Différentes cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées par les cellules spumeuses. Les cellules musculaires lisses migrent de la média vers l'intima, prolifèrent et sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire formant ainsi la plaque fibreuse (Glass and Witztum 2001).

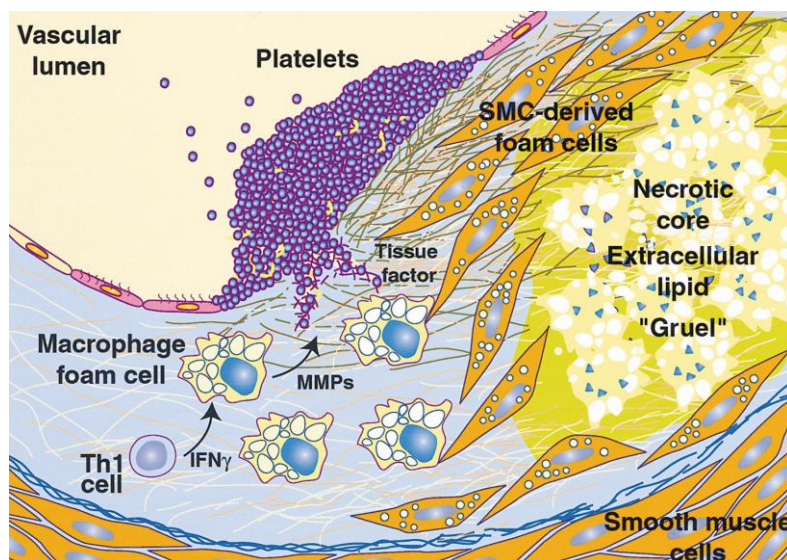


Figure I.6 : Lésions complexes et formation d'un thrombus

La mort des cellules spumeuses dérivées des macrophages ou des cellules musculaires lisses aboutit à la libération du contenu lipidique dans l'intima formant ainsi le centre nécrotique. La sécrétion de différentes protéases comme des métalloprotéinases par les macrophages ou les cellules musculaires lisses fragilisent la plaque fibreuse. La plaque vulnérable se caractérise par une fine chape fibreuse, une densité élevée en macrophages et un large corps nécrotique. La rupture de la plaque expose les facteurs tissulaires initiant la cascade de coagulation, l'adhérence plaquettaire et finalement la formation d'un thrombus (Glass and Witztum 2001).

les macrophages. Ce processus aboutit à la formation de cellules chargées en cholestérol et en lipides, les cellules spumeuses (**Figure I.4**). Ces dernières peuvent provenir des macrophages ou des cellules musculaires lisses. Les cellules spumeuses sont des marqueurs de lésions précoces, de stries lipidiques ainsi que de lésions tardives. Le devenir du cholestérol internalisé dans les macrophages peut être différent selon la voie métabolique. Il peut soit être estérifié par l'acyl-CoA, soit être stocké sous forme de gouttelettes lipidiques caractéristiques de ces cellules. Les esters de cholestérol ainsi formés peuvent être hydrolysés et incorporés dans les membranes ou exportés de la cellule. L'incorporation en membrane d'un excès de cholestérol inhibe l'activation protéolytique du facteur de transcription SREBP, intervenant dans la biosynthèse du cholestérol et l'expression des récepteurs LDL. Néanmoins, ce processus ne permet pas d'inhiber l'internalisation de cholestérol par les récepteurs scavengers ou les mécanismes de phagocytose (Glass and Witztum 2001).

Les cellules spumeuses secrètent différentes cytokines pro-inflammatoires aussi bien que les ROS qui amplifient la réponse inflammatoire au niveau de la lésion (Libby 2002) et contribuent à la progression de celle-ci (**Figure I.5**). Avec le temps, les vacuoles lipidiques deviennent de plus en plus grandes, ce qui entraîne la mort des cellules spumeuses et la libération du contenu lipidique dans l'intima formant ainsi le centre nécrotique (**Figure I.6**). L'apoptose des macrophages est un élément important dans le développement des plaques athéromateuses. Dans les lésions précoces, l'apoptose des macrophages diminue l'accumulation de macrophages au niveau de la lésion, ce qui réduit le développement de la plaque. Il existe donc une relation entre l'apoptose des macrophages et la taille de la lésion. Par contre, dans les lésions tardives, l'apoptose des macrophages est augmentée. Le corps nécrotique contient principalement des débris de macrophages. Les débris nécrotiques sont une source de stimuli pro-inflammatoires et de protéases qui peuvent induire des réponses inflammatoires et causer des dommages aux cellules proches (**Figure I.7**) (Tabas 2009).

1.4.4 Migration des cellules musculaires lisses

La transition d'une strie lipidique simple à une lésion plus complexe est caractérisée par la migration des cellules musculaires lisses provenant de la média vers l'intima. Dès qu'elles se trouvent dans l'intima, elles prolifèrent et incorporent des lipoprotéines modifiées formant dès lors des cellules spumeuses. Elles ont aussi la capacité de synthétiser différentes protéines de la matrice extracellulaire, ce qui conduit à la formation d'une chape fibreuse (**Figure I.5**). De plus, lors de la migration, les cellules musculaires lisses perdent leur phénotype contractile pour acquérir un phénotype prolifératif (Glass and Witztum 2001).

Différentes cytokines comme le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), le FGF (Fibroblast Growth Factor), IL-1 β , IL-6 et le TNF- α et divers facteurs de croissance sécrétés par les macrophages et les cellules T jouent un rôle important dans la migration des cellules musculaires lisses, leur prolifération et la production de matrice extracellulaire (Lusis 2000).

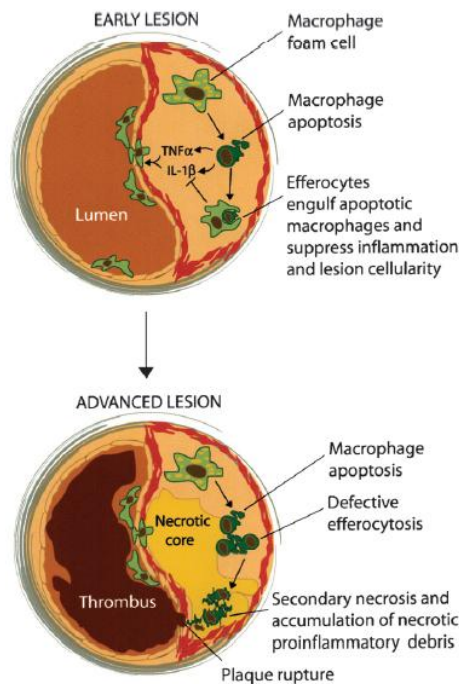


Figure I.7 : Apoptose des macrophages dans la plaque athéromateuse

Dans les lésions précoces, l'apoptose des macrophages diminue l'accumulation de macrophages au niveau de la lésion alors que dans les lésions tardives, l'apoptose des macrophages est augmentée. Le corps nécrotique est donc principalement constitué de débris de macrophages. Il existe donc une relation entre la taille de la lésion et l'apoptose des macrophages (Tabas 2009).

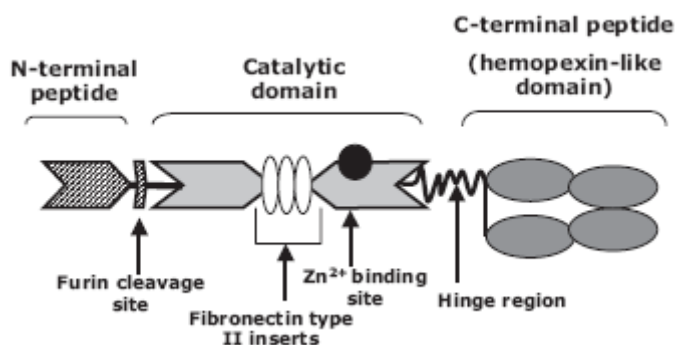


Figure I.8 : Structure des différents domaines des MMPs

Toutes les MMPs possèdent trois domaines : un pro peptide N-terminal, un domaine catalytique et une partie C-terminale. Le pro peptide N-terminal permet une latence enzymatique du pro-enzyme. Le domaine catalytique intervient dans le processus catalytique. La partie C-terminale interviendrait dans la spécificité de reconnaissance du substrat (Kukacka, Prusa et al. 2005).

1.4.5 Rupture de la plaque et formation d'un thrombus

La composition de la plaque athéromateuse et sa vulnérabilité sont des facteurs déterminants dans le développement d'un thrombus. La plaque vulnérable se caractérise par une fine chape fibreuse, une densité élevée en macrophages et un large corps nécrotique. Les macrophages ont la capacité de sécréter différentes protéases comme des métalloprotéinases (MMPs) qui dégradent la matrice extracellulaire. La rupture de plaque peut aussi avoir lieu dans des lésions riches en cellules spumeuses, ce qui suggère que des facteurs contribuant à l'inflammation peuvent influencer la formation d'un thrombus (**Figure I.6**).

D'autres facteurs tels que la néovascularisation peuvent fragiliser ces régions. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins implique le remodelage du tissu et l'activation de différentes protéases ; suggérant que ce phénomène pourrait contribuer à l'instabilité de la plaque et à sa rupture. De plus, les nouveaux vaisseaux formés sont fragiles et peuvent provoquer des microhémorragies.

La rupture de la plaque athéromateuse provoque l'exposition de lipides de la plaque et des facteurs tissulaires au sang initiant la cascade de coagulation, l'adhérence plaquettaire et la formation d'un thrombus (Glass and Witztum 2001) (Lusis 2000).

2. Métalloprotéinases (MMPs)

Les métalloprotéinases, enzymes contenant deux atomes de zinc, sont une famille de plus de 26 endopeptidases ayant une séquence protéique homologue, avec des structures de domaines conservés et des domaines spécifiques pour la spécificité du substrat et la reconnaissance d'autres protéines. Les MMPs ont pour rôle de dégrader la matrice extracellulaire (ECM) et les protéines connectées au tissu. Elles peuvent aussi jouer un rôle dans la progression de maladies comme l'athérosclérose, l'arthrite, l'anévrisme abdominal ou le cancer (Ye 2006) (Woessner 1991) (Newby 2005) (Amalinei, Caruntu et al. 2010).

2.1 Structure des MMPs

Les MMPs sont tout d'abord synthétisées sous forme de pro-enzyme et sécrétées en dehors de la cellule. La pro-MMP, forme inactive des MMPs, est organisée en 3 domaines structuraux : le pro-peptide N-terminal, le domaine catalytique et la partie C-terminale de la molécule. Le pro-peptide N-terminal contient 80 à 90 acides aminés dont des résidus cystéine qui peuvent interagir avec la molécule de zinc, ce qui permet une latence enzymatique du pro-enzyme. Le domaine catalytique, contenant 170 acides aminés, possède deux ions de zinc et deux à trois ions de calcium. Un des ions de zinc se trouve dans le site actif et participe directement au processus catalytique et le second ion de zinc, jouant un rôle structural, interagit avec Ca^{2+} . Le domaine C-terminal, contenant 210 acides aminés ayant une structure similaire à celle des protéines de la famille d'hémopexine, possède des domaines hemopexine-like et vitronectine-

MMP	Alternative Names	Group	Substrates
MMP-1	Collagenase (Type I, interstitial)	Collagenases	Collagens (I,II,III,VIII a X); gelatin; aggrecan; L-selectin; IL-1 β proteoglycans, entactin; ovostatin; MMP-2; MMP-9
MMP-2	Gelatinase A 72 kDa Gelatinase Type IV Collagenase	Gelatinases	Collagens (I,IV,V,VII,X,XI a XIV); gelatin; elastin; fibronectin; aggrecan; MBP; osteonectin; laminin-1; MMP-1; MMP-9; MMP-13
MMP-3	Stromelysin-1 Proteoglycanase	Stromelysins	Collagens (III,IV,V, a IX); gelatin; aggrecan; perlecan; decorin; laminin; elastin; casein; osteonectin; ovostatin; antactin; plasminogen; MBP; IL-1 β ; MMP-2/TIMP-2; MMP-7; MMP-8; MMP-9; MMP-13
MMP-7	Matrilysin Putative MMP	Matrilysins	Collagens (IV a X); gelatin; aggrecan; decorin; fibronectin; laminin; entactin; elastin; casein; transferrin; plasminogen; MBP; β 4-integrin; MMP-1; MMP-2; MMP-9; MMP-9/TIMP-1
MMP-8	Neutrophil collagenase	Collagenases	Collagens (I,II,III,V,VII,VIII a X); gelatin; aggrecan; fibronectin
MMP-9	Gelatinase B	Gelatinases	Collagens (IV,V,VII,X a XIV); gelatin; entactin; aggrecan; elastin; fibronectin; osteonectin; plasminogen; MBP; IL-1 β
MMP-10	Stromelysin-2	Stromelysins	Collagens (IIIV); gelatin; casein; aggrecan; elastin; MMP-1; MMP-8
MMP-11	Stromelysin-3	Stromelysins	Unknown (casein)
MMP-12	Macrophage metal- loelastase		Collagen IV; gelatin; elastin; casein; fibronectin; vitronectin; laminin; entactin; MBP; fibrinogen; fibrin; plasminogen
MMP-13	Collagenase-3	Collagenases	Collagens (I,II,III,IV,IX,X a XIV); gelatin; plasminogen; aggrecan; perlecan; fibronectin; osteonectin; MMP-9
MMP-14	MT1-MMP	Membrane MMP	Collagens (I-III); gelatin; casein; fibronectin; laminin; vitronectin; entactin; proteoglycans; MMP-2; MMP-13
MMP-15	MT2-MMP	Membrane MMP	Fibronectin; entactin; laminin; perlecan; MMP-2
MMP-16	MT3-MMP	Membrane MMP	Collagen III; gelatin; casein; fibronectin; MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	Membrane MMP	Unknown
MMP-18	Collagenase-4	Collagenases	Unknown
MMP-19	RAS1		Gelatin; aggrecan; fibronectin
MMP-20	Enamelysin		Amelogenin; aggrecan
MMP-21			Unknown
MMP-22			Unknown
MMP-23			Amelogenin
MMP-24	MT5-MMP	Membrane MMP	Pro-MMP 2
MMP-25	Leukolysin/MT6- MMP	Membrane MMP	Pro-gelatinase A; fibrin; fibronectin; collagen IV; gelatin
MMP-26	Endometase, matrilysin-2	Matrilysins	Gelatin Ia; P1; fibrinogen; fibronectin; vitronectin; β -casein
MMP-27			Unknown
MMP-28	Epilysin		Casein

Figure I. 9 : Classification des MMPs

Les MMPs sont classées en 6 groupes : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les Membrane MMPs et les autres MMPs (Kukacka, Prusa et al. 2005).

like qui interviendraient dans la spécificité de reconnaissance du substrat (**Figure I.8**) (Kukacka, Prusa et al. 2005).

2.2 Différentes MMPs

A l'heure actuelle, on dénombre 26 membres de la famille des MMPs dont 23 se retrouvent chez l'humain (**Figure I.9**). Les MMPs sont classées en 6 groupes :

- Collagénases (MMP-1, -8, -13 et -18) clivent le collagène de types I, II et III.
- Gélatinases, dont la gélatinase A (MMP-2) et la gélatinase B (MMP-9), digèrent la gélatine, une forme dénaturée du collagène, le collagène IV, la laminine et l'élastine.
- Stromélysines, dont la stromélysine-1 (MMP-3) et la stromélysine-2 (MMP-10), ont un grand répertoire de substrats dont plusieurs protéines de la matrice extracellulaire et protéoglycans.
- Membrane-Type MMPs (MT-MMPs) dont MT1-, MT2-, MT3- et MT4-. MT1- a la capacité de cliver le collagène I, de digérer des composés de la matrice extracellulaire et peut aussi activer des proMMPs comme proMMP-2 en MMP-2.
- les autres MMPs dont MMPs-11,-12,-19,-20,-22,-23, sont des MMPs différentes des autres par leur spécificité aux substrats ou leur séquence en acides aminés (Woessner 1991) (Newby 2005) (Amalinei, Caruntu et al. 2010).

Les MMPs sont sécrétées par différents types cellulaires comme des macrophages, des cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les lymphocytes T, les fibroblastes de l'adventice. Les cellules musculaires lisses sécrètent de manière constitutive la MMP-2.

2.3 Activation et inhibition des MMPs

La régulation des MMPs est un processus complexe qui fait appel à différents niveaux d'activation des MMPs dont la régulation de la transcription du gène, la sécrétion de l'enzyme ou encore une inhibition de l'activité des MMPs par des inhibiteurs de MMPs, les TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) :

- Régulation de l'expression des gènes encodant les MMPs : la majorité des gènes encodant les MMPs sont inductibles par différents agents chimiques tels que des esters de phorbol. Cependant, l'expression de ces gènes peut aussi être inhibée par différentes molécules comme le TGF- β . Les gènes encodant les MMPs sont exprimés seulement dans le cas où le tissu subit un remodelage en des conditions physiologiques ou en réponse à des conditions pathologiques. L'expression de ces gènes est influencée par des interactions cellule-cellule ou cellules-ECM.
- Clivage du pro-peptide : Après un clivage du pro-peptide, la pro-MMP, forme inactive, devient une MMP, forme active (Kukacka, Prusa et al. 2005). La MMP-

14 ou aussi appelé la MT1-MMP, clive le pro-MMP2 en MMP2 (Amalinei, Caruntu et al. 2010).

- Inhibition des MMPs par des TIMPs : Les TIMPs, protéines de 21 à 30 kDa, sont les principaux régulateurs endogènes des MMPs au sein des tissus. De nos jours, on dénombre différents TIMPs : TIMP-1,-2,-3,-4. Ces inhibiteurs se lient aux MMPs selon un ratio 1 :1, formant ainsi un complexe non covalent binaire avec un K_d très haut (10^{-9} - 10^{-10}) (Kukacka, Prusa et al. 2005). Dans les artères humaines normales, MMPs et TIMPs sont exprimés de manière constitutive à des niveaux fournissant une balance stable entre la dégradation de la matrice endogène et la production de la matrice. Par contre, en conditions pathologiques, les MMPs sont up-régulées, ce qui amène à des changements pathologiques dans la structure des vaisseaux sanguins et peut conduire à la rupture de la plaque athéromateuse (Woessner 1991) (Chandrasekar, Mummididi et al. 2006) (Oviedo-Orta, Bermudez-Fajardo et al. 2008).

2.4 Implication des MMPs dans l'athérosclérose

Au sein des plaques athéromateuses, une production importante de différentes MMPs comme MMP-3, MMP-1, MMP-2 et MMP-9 par les cellules musculaires lisses et les macrophages est détectée. Ces MMPs participent à la dégradation de la matrice extracellulaire dans l'intima, ce qui peut conduire à la rupture de la plaque et à la formation d'un thrombus. Ces MMPs permettent aussi la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima où celles-ci peuvent proliférer. Les MMPs sont donc des régulateurs importants de la progression des plaques athéromateuses (Amalinei, Caruntu et al. 2010).

Gough et ses collaborateurs ont démontré que la MMP9 active était fortement exprimée dans les macrophages, ce qui induirait la rupture de la plaque athéromateuse chez les souris Apo E^{-/-} (Gough, Gomez et al. 2006).

Ohshima et ses collaborateurs ont également démontré que chez les souris Apo E^{-/-}, la surexpression de MMP9 dans les macrophages est observée dans les lésions athéromateuses avancées et est souvent associée à la rupture de la plaque. De plus, les souris Apo E^{-/-} déficiente en MMP9 ont une réduction des lésions athéromateuses en comparaison à celles des souris Apo E^{-/-}. Ceci est aussi observé chez les souris Apo E^{-/-} déficientes en MMP2. Toutes ces observations suggèrent l'implication des MMPs dans le développement de plaque athéromateuse (Ohshima, Petrov et al. 2009).

3. Médiateurs issus de l'acide arachidonique

Parmi les molécules impliquées dans la formation d'un thrombus, les prostanoïdes sont un acteur principal. De plus, ils semblent jouer un rôle important dans l'athérosclérose. En effet, la production de thromboxane A₂ (TXA₂) et d'isoprostanés est augmentée dans le sang des

patients atteints d'athérosclérose et dans les plaques athéromateuses elles-mêmes (Dogne, Hanson et al. 2005).

3.1 Thromboxane A₂

Le thromboxane A₂ est un métabolite dérivé de l'acide arachidonique, ayant une durée de vie de 30 secondes. Il est essentiellement produit par des plaquettes activées ou des macrophages mais aussi par différents types cellulaires comme les monocytes ou les cellules musculaires lisses (Nakahata 2008) (Rolin, Hanson et al. 2007).

3.1.1 Métabolisme de l'acide arachidonique (voie enzymatique)

L'acide arachidonique, un acide gras polyinsaturé composé de vingt atomes de carbone et ayant quatre doubles liaisons, est impliqué dans de nombreuses voies enzymatiques aboutissant à la formation de nombreuses molécules telles que les prostaglandines, la prostacycline, le thromboxane A₂ et les leucotriènes (Gryglewski 2008). L'acide arachidonique provient de l'hydrolyse des phospholipides membranaires qui libèrent les acides gras en position 1 et 2. Cette hydrolyse catalysée par la phospholipase A₂ (PLA₂) aboutit à la libération de l'acide arachidonique qui peut dès lors aller dans différents compartiments cellulaires et être disponible pour différentes enzymes. Il existe différentes PLA₂ dont PLA₂ sécrétoire (sPLA₂), la PLA₂ cytoplasmique (cPLA₂) et les PLA₂ indépendantes du calcium. La cPLA₂ intervient dans la cascade de l'acide arachidonique. L'activité de cette enzyme est dépendante de la concentration en calcium tandis que sa translocation vers la membrane du réticulum endoplasmique est la conséquence de la phosphorylation par les MAPKinases (Burke and Dennis 2009).

Dès que l'acide archidonique est libéré des phospholipides membranaires, ce dernier peut être le substrat de différentes voies métaboliques impliquant les cyclooxygénases, les lipoxygénases (LOX) ou les époxygénases. Toutes ces voies sont en compétition pour ce substrat. La première voie permet de convertir l'acide arachidonique en prostaglandine D₂ (PGD₂), E₂ (PGE₂), F_{2α} (PGF_{2α}), en prostacycline (PGI₂) et en TXA₂ (Dogne, Hanson et al. 2005). La deuxième voie permet la formation de leucotriènes, d'hépoxylines et de lipoxines (Serhan, Hamberg et al. 1984). Enfin, la troisième voie induit la formation d'époxydes .

3.1.2 Cyclooxygénases

Les cyclooxygénases sont des enzymes impliquées dans la biosynthèse des prostaglandines, des prostacyclines et du TXA₂.

Il existe deux principales isoformes des cyclooxygénases : COX-1 et COX-2. La cyclooxygénase 1, COX-1, est exprimée de manière constitutive dans de nombreux tissus

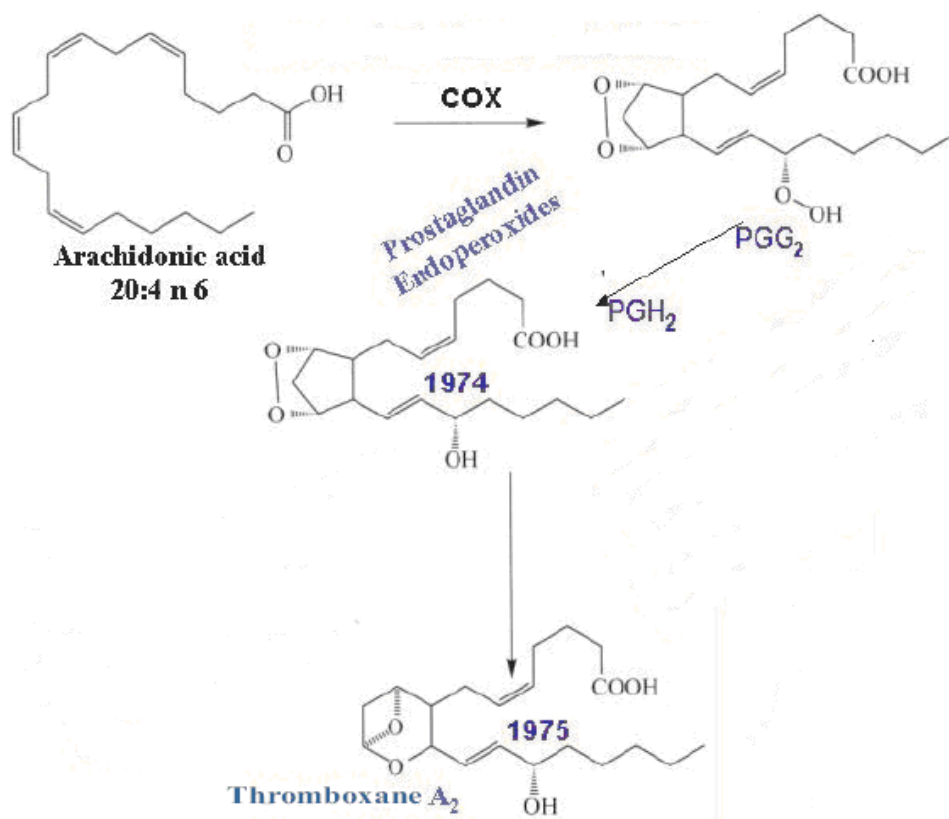


Figure I. 10 : Rôle des cyclooxygénases dans la production de thromboxane A₂ et de PGE₂ à partir d'acide arachidonique

Suite à l'action des COX, l'acide arachidonique est tout d'abord converti en prostaglandine H₂. La première étape consiste à former la prostaglandine G₂ (PGG₂). Cette prostaglandine est ensuite rapidement convertie en prostaglandine H₂ (PGH₂) suite à l'action peroxydase de la COX. PGH₂ est finalement transformée enzymatiquement en thromboxane A₂ par une thromboxane synthase (Gryglewski 2008).

tandis que la cyclooxygénase 2, COX-2, est principalement induite dans les sites inflammatoires. Ces deux enzymes ont 60% d'homologie au niveau de leur séquence. De ce fait, leur structure tridimensionnelle est superposable et est caractérisée par un domaine de facteur de croissance épidermal, un domaine de liaison à la membrane et un domaine catalytique qui contient un site actif de cyclooxygénase et un site actif de peroxydase. COX-1 est impliquée dans des fonctions homéostatiques et dans la protection gastrique alors que COX-2 interviendrait dans la régulation des processus inflammatoires (Dogne, Hanson et al. 2005) (Rouzer and Marnett 2009). Une troisième isoforme, COX-3, a été découverte. Cette isoforme est issue du gène de COX-1 par épissage alternatif et est principalement exprimé dans le système nerveux central chez l'animal (Warner and Mitchell 2002).

Suite à l'action des COX, l'acide arachidonique est tout d'abord converti en prostaglandine H_2 . Cette réaction se déroule en deux étapes. La première étape consiste à oxyder et à cycliser l'acide arachidonique pour former de la prostaglandine G_2 (PGG_2). Cette prostaglandine, molécule instable, est rapidement convertie en prostaglandine H_2 (PGH_2) suite à l'action peroxydase de la COX. PGH_2 est ensuite transformée enzymatiquement en TXA_2 par une thromboxane synthase ou en prostacycline (PGI_2) par une PGI_2 synthase. D'autres prostaglandines comme PGE_2 , PGD_2 , et $PGF_{2\alpha}$ sont aussi formées à partir de ce substrat suite à l'action d'enzymes spécifiques (**Figure I.10**) (Dogne, Hanson et al. 2005) (Rouzer and Marnett 2009).

3.1.3 Rôle du thromboxane A_2

Le TXA_2 , une molécule très instable, est rapidement dégradé en thromboxane B_2 (TXB_2), une forme inactive. TXA_2 agit sur les cellules se trouvant autour de son site de production, soit de manière autocrine, soit de manière paracrine.

Il a un puissant pouvoir contractile sur les cellules musculaires lisses vasculaires, ou encore sur les muscles lisses des bronches, de l'intestin, de l'utérus et de la vessie. Il a aussi la capacité d'activer les plaquettes aboutissant à leur agrégation, ce qui favorise la formation d'un thrombus. Le TXA_2 accélère aussi l'expression des protéines d'adhérence comme ICAM-1 ou VCAM-1 chez les cellules endothéliales. Le TXA_2 agit également sur d'autres organes tels que le système nerveux central, le système nerveux périphérique ou le rein (Nakahata 2008).

3.2 Isoprostane

3.2.1 Métabolisme de l'acide arachidonique (voie non enzymatique)

Les isoprostanes sont une famille d'isomères de prostaglandines formées via des radicaux libres par une voie non-enzymatique de peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés. La biosynthèse de ces molécules est basée sur l'attaque des phospholipides par des molécules hautement réactives. Ces dernières attaquent les liaisons insaturées de l'acide arachidonique

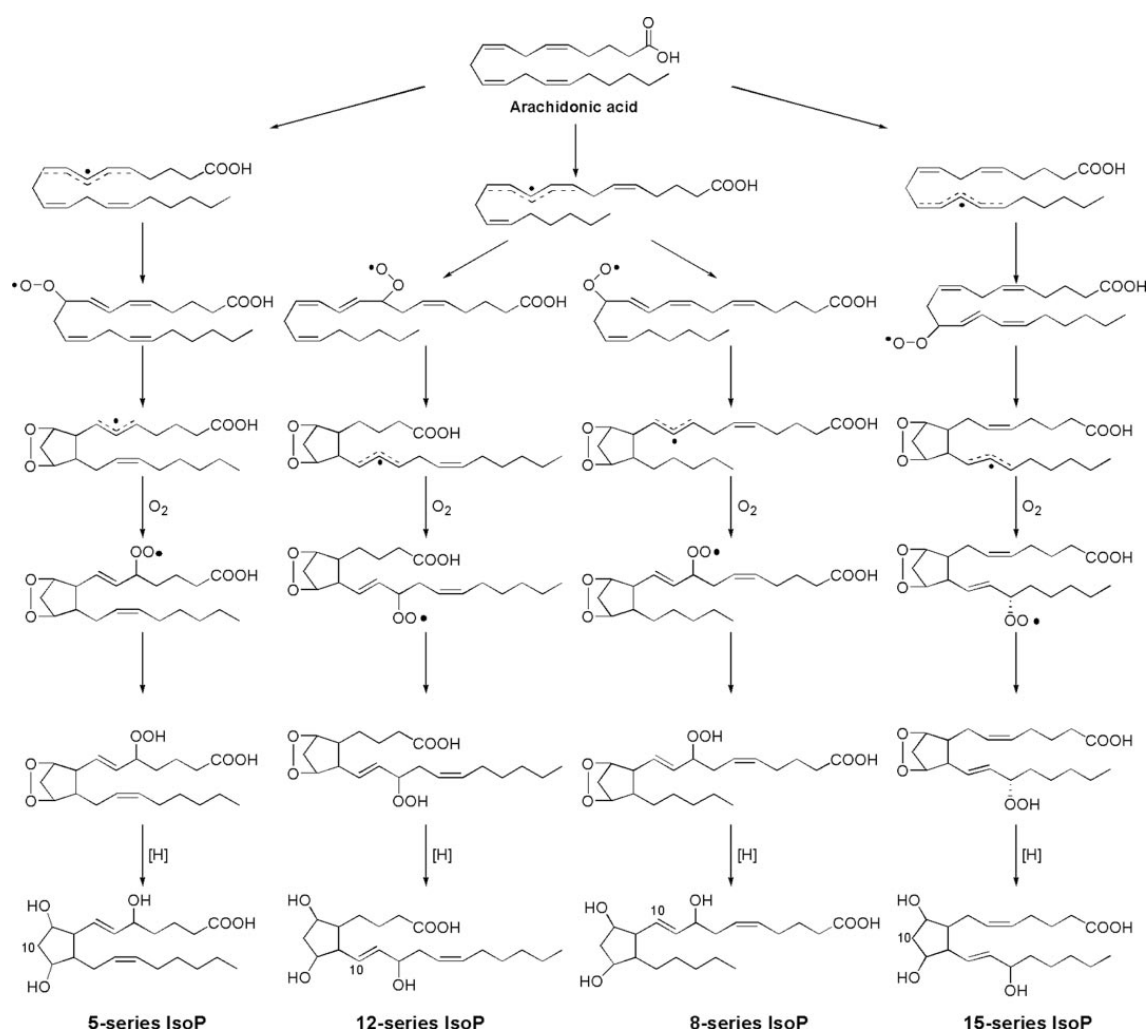


Figure I. 11 : Formation d'isoprostane via une voie non-enzymatique de peroxydation lipidique de l'acide arachidonique

La biosynthèse de cette molécule aboutit à la formation de quatre régioisomères d'isoprostane F_2 (Milne, Yin et al. 2008).

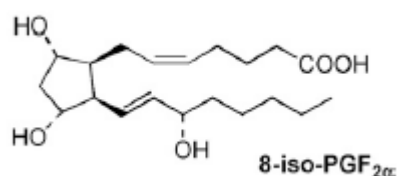


Figure I.12 : Structure chimique du 8-iso-PGF_{2α} (Rolin, Hanson et al. 2007).

aboutissant à la formation de radicaux arachidonyles. Ceux-ci interagissent ensuite avec l'oxygène moléculaire pour former des radicaux peroxydes. Les radicaux subissent ensuite une 5-exo-cyclisation et une molécule d'oxygène est par après ajoutée pour former un composé PGG₂-like. L'intermédiaire bicycloendoperoxyde instable est enfin réduit en isoprostane F₂. Basé sur le même mécanisme, quatre régioisomères d'isoprostane F₂ sont produits. Selon la position du radical peroxyde, différents régioisomères peuvent être formés dans la même série. Au sein de la série F₂ se trouve l'isoprostane de type III aussi appelé 8-iso-PGF_{2α} (**Figure I.11** et **Figure I.12**) (Milne, Yin et al. 2008).

Le 8-iso-PGF_{2α} peut soit provenir d'une peroxydation des phospholipides membranaires, soit des phospholipides contenus dans les LDL.

3.2.2 Rôle du 8-iso-PGF_{2α}

Le 8-iso-PGF_{2α}, un potentiel vasoconstricteur, est également impliqué dans la régulation à l'activation plaquettaire, la formation de TXA₂ aussi bien que la prolifération des cellules musculaires lisses. Il augmente aussi l'expression de diverses cytokines comme l'interleukine-1 β (IL-1β), de MMPs provenant des macrophages et intervient dans la formation des cellules spumeuses.

De plus, le niveau d'isoprostane est plus élevé dans les plaques athéromateuses que dans les parois des artères saines. Différents facteurs de risques tels que l'hypercholestéromie, le diabète, le tabagisme ou l'obésité peuvent stimuler la synthèse d'isoprostane F₂ (Dogne, Hanson et al. 2005) (Pratico, Lawson et al. 2001).

3.3 Récepteur TP

Le TXA₂ et le 8-iso-PGF_{2α} exercent leur fonction via un récepteur couplé à une protéine G appelé le récepteur TP. Dès que le récepteur TP est stimulé, ce dernier induit l'activation de différentes cascades de signalisation qui régulent le cytosquelette, l'adhérence cellulaire, la mobilité, la prolifération, la survie cellulaire et l'apoptose (Nakahata 2008).

3.3.1 Distribution du récepteur TP

Des taux élevés d'ARNm encodant le récepteur TP sont détectés dans le thymus et le foie mais aussi dans les poumons, les reins, l'utérus, le cœur et le cerveau. Ceci suggère que le récepteur TP pourrait être impliqué dans le système immunitaire. De nombreux types cellulaires tels que les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses expriment aussi le récepteur TP (Nakahata 2008).

3.3.2 Structure et isoforme du récepteur TP

Le récepteur TP est un membre de la super famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Le gène encodant pour le récepteur TP est localisé sur le chromosome 19q13.3 et est présent en une seule copie. Le récepteur TP humain

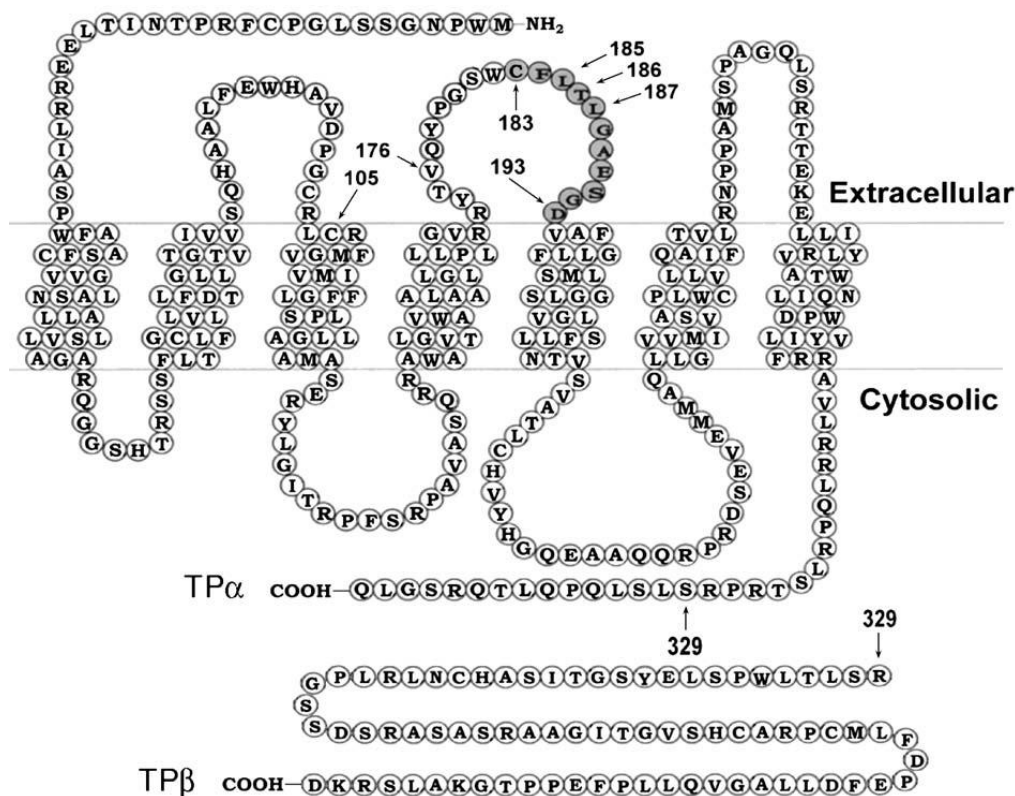


Figure I.13 : Structure et isoforme du récepteur TP

Le récepteur TP est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G. Les deux isoformes, TPα et TPβ, ont 323 acides aminées en commun du côté N-terminal et diffèrent de 15 et 79 acides aminés du côté C-terminal, respectivement (Huang, Ramamurthy et al. 2004).

existe sous deux isoformes : TP α (cloné à partir du placenta) et TP β (cloné à partir de cellules endothéliales). Ces deux isoformes ont 323 acides aminés du côté N-terminal en commun mais diffèrent du côté C-terminal. Les récepteurs TP α et TP β ont 15 et 79 acides aminés en plus dans leur séquence commune. Cette différence est due à un mécanisme d'épissage alternatif qui consiste à ce que l'exon 3 de l'ARNm soit considéré comme intron formant l'isoforme α (**Figure I.13**) (Nakahata 2008) (Huang, Ramamurthy et al. 2004).

3.3.3 Transduction du signal

Dès que le TXA₂ ou le 8-iso-PGF_{2 α} se lie au récepteur TP, la protéine G est activée. Le récepteur TP communique avec différentes protéines G, chacune d'elles régule un effecteur différent tel que la phospholipase C, le facteur GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) ou l'adénylate cyclase.

La première protéine G couplée au récepteur TP découverte a été la G_q. Cependant, le récepteur TP communique aussi avec d'autres protéines telles que G₁₂ et G₁₃, G_i, G_s et G_h. Les deux principales protéines G interagissant avec le récepteur TP sont les protéines G₁₂/G₁₃ et G_q.

Dès que la protéine G_q est stimulée, la phospholipase C- β est activée et catalyse l'hydrolyse de la phosphatidyl biphosphate inositol en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). IP3 se lie à son récepteur présent sur le réticulum endoplasmique et induit la libération de Ca²⁺ dans le cytoplasme tandis que le DAG reste ancré en membrane et recrute et active la PKC. La PKC module l'action de différentes protéines cellulaires comme celles intervenant dans la voie des MAPK qui induit la prolifération cellulaire. La dégradation du DAG peut aboutir à la formation de l'acide arachidonique.

Par ailleurs, la stimulation des protéines G₁₂/G₁₃ active le facteur RhoGEF. Ce dernier intervient dans différents événements biologiques comme la mobilité cellulaire, la contraction, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Nakahata 2008).

3.4 Implication du TXA₂ et de l'isoprostane dans l'athérosclérose

Afin d'évaluer le rôle du TXA₂ dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose, Kobayashi et ses collaborateurs ont réalisé une étude visant à montrer qu'une déficience en récepteur TP chez des souris Apo E^{-/-} réduisait le processus athérogénique suite à une diminution du dysfonctionnement de l'endothélium, de la réactivité plaquettaire et de l'adhérence des leucocytes à l'endothélium. Les souris Apo E^{-/-} développent de nombreuses lésions athéromateuses, équivalentes à celles observées chez l'homme, tandis que les souris Apo E^{-/-} TP^{-/-} ont une diminution significative des plaques athéromateuses. De plus, le niveau d'expression d'ICAM-1 chez les souris Apo E^{-/-} est fortement élevé alors que chez les souris Apo E^{-/-} TP^{-/-} il est diminué. Toutes ses observations suggèrent que le TXA₂ aurait des actions pro-athérogéniques (Kobayashi, Tahara et al. 2004).

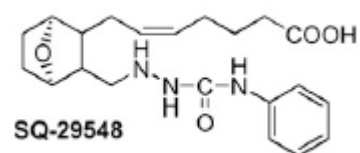


Figure I.14 : Structure chimique des antagonistes du récepteur TP : BM-520 et SQ29548
(Rolin, Hanson et al. 2007)

Le 8-iso PGF_{2α} interviendrait aussi dans le processus athérogenèse dû à sa présence au sein des plaques athéromateuses. De plus, une corrélation entre de faible taux de cet isoprostane et une diminution du processus athérogenèse suggère un rôle possible de cet isoprostane dans le développement de l'athérosclérose (Tang, Cyrus et al. 2005).

3.5 Modulation de la transduction du signal du récepteur TP

Etant donné que le TXA₂ et le 8-iso-PGF_{2α} interviennent dans le processus d'athérogenèse, la modulation de leur synthèse et/ou leur action peut s'avérer intéressante d'un point de vue pharmacologique.

La synthèse de l'acide arachidonique par les COX-1 et les COX-2 aboutit à la formation de TXA₂. Les inhibiteurs de COX tels que l'aspirine ou les coxibs peuvent réduire la production de TXA₂.

L'aspirine, à faible dose, inhibe la COX-1 empêchant la production de TXA₂ et l'agrégation plaquettaire ce qui aboutit à une diminution des risques d'accidents cardiovasculaires et de la croissance d'un thrombus. Cependant, l'aspirine ne permet pas d'inhiber la production d'autres ligands du récepteur TP tels que les isoprostanes.

Les coxibs, inhibiteurs de la COX-2, permettent d'inhiber la production de prostaglandines inflammatoires. Cependant, ils empêchent aussi la formation endogène de PGI₂, un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et un vasodilatateur, sans affecter la production de TXA₂ par la COX-1 ou celle de l'isoprostane par voie non-enzymatique. Les antioxydants et les inhibiteurs de thromboxane synthase bloquent la formation d'isoprostane en diminuant la peroxydation lipidique de l'acide arachidonique et inhibent la synthèse du TXA₂, respectivement. Cependant, l'inhibition de la synthèse du TXA₂ et de l'isoprostane est difficile à réaliser en un seul traitement. C'est pourquoi, des molécules bloquant le récepteur TP ont été développées.

Contrairement aux agonistes, molécules se liant et induisant l'activation du récepteur TP, les antagonistes sont des molécules qui se fixent au récepteur TP et empêchent l'action du récepteur pour tous les ligands naturels. La voie de transduction du signal est par après bloquée. De nombreux antagonistes au récepteur TP ont été développés, celui de référence est le SQ29548 (**Figure I.14**). Cette molécule est considérée comme le plus puissant. D'autres molécules comme BM-573 ou BM-520 ont été synthétisées (**Figure I.14**). BM-520, un régioisomère de BM-573, est considéré comme un antagoniste TP spécifique *in vivo* et *in vitro* (Rolin, Hanson et al. 2007). BM-520 a une grande activité anti-thromboxane A₂ dans de nombreux modèles pharmacologiques. BM-520 a aussi une meilleure affinité pour le récepteur TP (IC₅₀ : 4.0 nM) que le BM-573 (IC₅₀ : 130 nM) et que SQ29548 (IC₅₀ : 21 nM) (Nakahata 2008) (Dogne, Hanson et al. 2005) (Rolin, Hanson et al. 2007).

4. Objectif du mémoire

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique. Cette maladie se caractérise par de nombreuses interactions entre les lipoprotéines modifiées, les macrophages dérivés des monocytes et les différents éléments de la paroi artérielle tels que les cellules musculaires lisses.

La migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima est une des étapes clé dans le processus d'athérogenèse. Elle est médiée via la libération de métalloprotéinases notamment à partir des cellules musculaires lisses. Ces métalloprotéinases, ou MMPs, dégradent la matrice extracellulaire et peuvent ainsi influencer la stabilité de la plaque athéromateuse. Une étude a démontré que chez les souris Apo E^{-/-}, la MMP9 est fortement exprimée et induit la rupture de la plaque athéromateuse (Gough, Gomez et al. 2006). De plus, Kuzuya et al. ont démontré que les souris Apo E^{-/-} MMP2^{-/-} avait une réduction significative des plaques athéromateuses comparé aux souris ApoE^{-/-} MMP2^{+/+} (Kuzuya, Nakamura et al. 2006). Ces observations suggèrent l'implication des MMPs dans le processus d'athérogenèse et dans l'instabilité de la plaque athéromateuse.

Le processus d'athérogenèse est influencé par de nombreux médiateurs. Parmi eux, le thromboxane et les isoprostanes semblent jouer un rôle important. En effet, la production de thromboxane et d'isoprostane est plus élevée dans les plaques athéromateuses et dans le sang de personnes souffrant d'athérosclérose. Ces deux médiateurs exercent leur rôle via le même récepteur TP. Kobayashi et al. ont démontré que les souris Apo E^{-/-} développent de nombreuses lésions athéromateuses tandis que chez les souris Apo E^{-/-} TP^{-/-}, une réduction significative des lésions athéromateuses est observable (Kobayashi, Tahara et al. 2004). Ceci suggère l'implication de ces médiateurs dans le développement de l'athérosclérose.

L'objectif principal de ce travail est de caractériser l'effet de deux agonistes du récepteur TP : le TXA₂ et le 8-iso-PGF_{2α} dans la production de MMPs par les cellules musculaires lisses aortiques humaines (AoSMCs). Une fois le premier objectif atteint, l'effet des deux agonistes sur la migration des AoSMCs sera étudié. Parallèlement, l'effet du TXA₂ et du 8-iso-PGF_{2α} dans l'induction à un phénotype inflammatoire dans ces cellules a été investigué dans ce mémoire. Etant donné que le TXA₂ est rapidement dégradé, le U46619, un analogue du thromboxane A₂, est utilisé comme agoniste du récepteur TP. La modulation à l'activation au récepteur TP est une cible thérapeutique pour retarder ou empêcher le développement de l'athérosclérose. De ce fait, l'effet de deux antagonistes du récepteur TP : SQ29548 et BM-520 sont également décrits dans ce mémoire.

L'ensemble de ces résultats nous permettra de mieux comprendre l'effet des agonistes du récepteur TP dans le développement de l'athérosclérose.

II. Matériel et méthodes

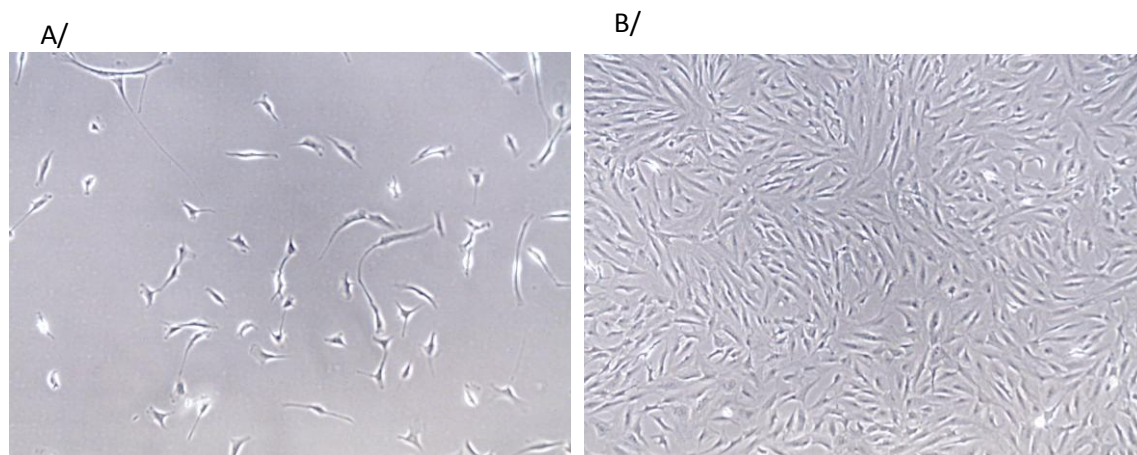


Figure II.1 : Ensemencement des cellules musculaires lisses aortiques humaines (AoSMC) dans une T25. A : 125 00 cellules/ T25, B : quatre jours plus tard dans la même T25 (Grossissement 10X).

Compléments	Volume ajouté (ml) dans 500 ml de milieu SmBM	Source
Insuline	0,5	Lonza, USA
hFGF (human Fibroblast Growth Factor- basic)	1	Lonza, USA
GA-100	0,5	Lonza, USA
FBS (Fetal Bovine Serum)	25	Lonza, USA
hEGF (human Epidermal Growth Factor)	0,5	Lonza, USA

Tableau II.1 : Compléments ajoutés dans le milieu SmBM.

II. Matériel et Méthodes

1. Culture cellulaire

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé des cellules musculaires lisses aortiques humaines (AoSMC) provenant de l'entreprise Lonza (USA). La morphologie des cellules ressemble à celle des fibroblastes : les cellules sont allongées et présentent des prolongements cytoplasmiques. Elles ont été cultivées dans des boîtes de 25 cm², des plaques 6 puits, des plaques 12 puits ou encore des plaques 24 puits. Dans les boîtes de 25 cm², les cellules sontensemencées à une densité de 3 500 cellules/cm² ce qui représente 125 000 cellules ensemencées dans la boîte de 25 cm² (**Figure II.1**). Après 4 jours, les cellules arrivent à 70-80% de confluence (**Figure II.1**). Ces cellules sont cultivées dans du milieu SmGM-2 medium, milieu contenant divers compléments (**Tableau II.1**), à 37°C, avec une atmosphère contenant 5% de CO₂.

1.1 Matériel

- Milieu de culture SmGM-2 medium contenant les compléments (**Tableau II.1**) (Lonza, USA)
- Trypsine/EDTA (Lonza, USA)
- PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (Lonza, USA)
- DMEM (Gibco, UK)
- Tubes 10 ml (Sterilin, UK)
- Boîtes de culture de 25cm² (T25) (Costar, USA)
- Plaques de 6 puits (Costar, USA)
- Plaques de 12 puits (Costar, USA)
- Plaques de 24 puits (Costar, USA)
- Pipettes stériles (2, 5, 10 et 25 ml) (Costar, USA)
- Incubateur à 37°C (5% de CO₂) (Thermo Electron Corporation, USA)
- Centrifugeuse 5702 (Eppendorf, Allemagne)
- Hotte à flux laminaire Gelaire (Air flow monitor, AFA 100, Angleterre)

1.2 Méthode

Le repiquage des cellules a lieu dans des conditions stériles et lorsque les cellules ont atteint un degré de confluence élevé (70 à 80% de confluence). Il faut éviter qu'elles dépassent ce degré de confluence car au delà elles se différencient et forment des nodules. C'est aussi la raison pour laquelle le milieu de culture, le PBS et le milieu servant à inhiber la trypsine/EDTA (DMEM + 10 % de sérum) ne sont pas préchauffés à 37°C. Par contre, la trypsine/EDTA est préchauffée à 37°C. Les boîtes de culture sont tout d'abord rincées 2 fois avec 3 ml de PBS puis 1,5 ml de trypsine/EDTA sont ajoutés dans chaque T25 pendant 1 à 2 minutes. Après observation au microscope du détachement des cellules, la trypsine/EDTA est neutralisée par l'ajout de 3,5 ml de DMEM + 10 % de sérum. Pour éliminer la trypsine/EDTA, la suspension des cellules est ensuite centrifugée 5 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est décanté et le culot est resuspendu dans du milieu de culture SmGM-2 medium. La suspension cellulaire est finalement distribuée dans de nouvelles boîtes de culture T25 pour continuer la culture cellulaire ou dans des T25, des plaques 6 puits, des plaques 12 puits ou des plaques 24 puits à différentes densités pour réaliser les différentes expériences.

HBSS (4°C)	0,137 M NaCl 5,36 mM KCl 440 nM KH_2PO_4 5 mM Glucose 299 nM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4,2 mM NaHCO_3
HBSS complet (t° ambiante)	HBSS 0,16 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,24 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH = 7,35

Tableau II.2 : Composition du HBSS complet.

2. Stimulation des cellules

2.1 Molécules utilisées :

- U46619 (Cayman, Chemical®, USA) : Analogue du thromboxane et agoniste du récepteur TP, il est resuspendu dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) (Sigma Aldrich, USA) et stocké à une concentration de $3 \cdot 10^{-2}$ M (solution mère), à -20°C. Il est généralement utilisé à une concentration de 1 μ M.
- 8-iso-PGF_{2 α} (Cayman, Chemical®, USA) : Agoniste du TP récepteur, il est resuspendu dans du DMSO (Sigma Aldrich, USA) et stocké à une concentration de $2 \cdot 10^{-2}$ M (solution mère), à -20°C. Il est généralement utilisé à une concentration de 50 μ M.
- BM-520 (synthétisé dans le département de Pharmacie aux FUNDP, Belgique) : Antagoniste du récepteur TP, il est resuspendu dans du DMSO (Sigma Aldrich, USA) et stocké à une concentration de $2 \cdot 10^{-3}$ M (solution mère), à -20°C. Il est généralement utilisé à une concentration de 1 μ M.
- SQ29548 (Cayman, Chemical®, USA) : Antagoniste du récepteur TP, il est resuspendu dans du DMSO (Sigma Aldrich, USA) et stocké à une concentration de $2 \cdot 10^{-3}$ M (solution mère), à -20°C. Il est généralement utilisé à une concentration de 1 μ M.
- IL-1 β (R&D systems, USA) : Cytokine pro-inflammatoire, elle est resuspendue dans du PBS + 0,1 % de BSA et stockée à une concentration de 10 μ g/ml (solution mère), à -70°C. Elle est généralement utilisée à une concentration de 3 ng/ml.
- IL-18 (MBL Medical & Biological Laboratories CO., Japan) : Cytokine pro-inflammatoire et pro-athérogénique, elle est resuspendue dans de l'eau et stockée à une concentration de 100 μ g/ml (solution mère), à -70°C. Elle est généralement utilisée à une concentration de 10 ng/ml.
- SIN-1 (Invitrogen Molecular Probes®, USA) : 3-morpholinosydnone N-ethylcarbamide, molécule impliquée dans la libération de peroxy-nitrite, elle est resuspendue dans de HBSS complet (**Tableau II. 2**) et stockée à une concentration de 10 mM, à -20°C. Elle est généralement utilisée à une concentration de 0,5 mM.

2.2 Méthode

Avant toute stimulation, les cellules sont privées de sérum pendant 24 heures. Pour cela, le milieu de culture est remplacé par du milieu de culture basal (SmBM) contenant 0,5 % de BSA (*Bovin Serum Albumin*) (PPA Laboratories GmbH, Australia). Après cette mise au repos, les cellules sont incubées pendant 24 heures avec du U46619 à 1 μ M, du 8-iso-PGF_{2 α} à 50 μ M, de l'IL-1 β à 3 ng/ml, de l'IL-18 à 10 ng/ml ou du SIN-1 à 0,5 mM. Pour certaines expériences, les cellules sont pré-incubées avec ou sans les antagonistes du récepteur TP, du BM-520 à 1 μ M ou du SQ29548 à 1 μ M, une heure avant l'incubation en présence des différentes molécules pro-inflammatoires.

3. Mesure de l'expression de gènes par RT-PCR en temps réel

La PCR en temps réel permet de quantifier l'ADNc présent dans un échantillon donné. Cette technique se base sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent, le SYBR Green, un agent intercalant de l'ADN double brin. Lors de la phase de polymérisation de la réaction de PCR, un nombre élevé de molécules se lie au brin naissant et l'augmentation de la fluorescence est suivie en temps réel. L'augmentation du signal fluorescent est donc proportionnelle à la quantité d'amplicons générés. L'analyse de l'expression de gènes se déroule en plusieurs étapes.

3.1 Extraction de l'ARN total

L'extraction est réalisée à partir de boîtes T25. Afin d'obtenir de bonne qualité d'ARN, l'extraction se déroule dans des conditions « RNase Free ». Pour éviter toutes actions RNases endogènes et exogènes, différentes précautions doivent être prises telles que : l'utilisation du matériel exempt de RNase, le port de gants en latex RNase free et le traitement de l'espace de travail au SDS 1%.

3.1.1 Matériel

- | | |
|---|---|
| • Buffer RLT (Qiagen, Allemagne) | • H ₂ O RNase free |
| • Buffer RW1 (Qiagen, Allemagne) | • QIAcube (Qiagen, Allemagne) |
| • Buffer RPE (Qiagen, Allemagne) | • Spectrophotometer Nanodrop ND-100 (Isogen Life Science, Pays-Bas) |
| • Ethanol 75% RNase free (Merck, Allemagne) | • Grattoir cell scraper (SPL Life Sciences, Pays-Bas) |

3.1.2 Méthode

Les différents milieux de culture sont récoltés pour effectuer ensuite des mesures d'activité de MMPs par zymographie et placés sur glace en attendant de les centrifuger à 13 000 rpm pendant 5 minutes dans le but d'enlever tous les débris cellulaires. Après centrifugation, 1 ml de surnageant est récolté et stocké à - 70°C. Afin de rincer les cellules, 2 ml de PBS sont déposés par T25 et ensuite décantés. 350 µl de buffer RLT sont ajoutés dans chaque T25 et les cellules sont raclées avant d'être transférées dans des microtubes de 2 ml. Des microtubes de 1,5 ml, des tips, les différentes solutions telles que le buffer RW1, le buffer RPE et l'éthanol 75% RNase free sont préparés pour lancer l'extraction d'ARN à l'aide du QIAcube. Dès que l'ARN est extrait, la quantité d'ARN de chaque échantillon est déterminée à l'aide d'une mesure d'absorbance à 260 nm à l'aide du Nanodrop.

3.2 Rétro-transcription

Cette étape consiste à synthétiser de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN précédemment extrait.

3.2.1 Matériel

Kit transcriptor first strand cDNA synthesis (Roche, Allemagne):

- | | |
|-------------------------------|-------------------------|
| • Oligonucleotide (dT) primer | • Reverse transcriptase |
|-------------------------------|-------------------------|

Mix/tube	
Buffer RT 5X	4 µl
Transcriptase Inverse	0,5 µl
Ribonuclease Inhibitor	0,5 µl
dNTP mix	2 µl

Tableau II.3 : Composition du mix pour la reverse transcription.

Gènes	Foward/Reverse	Amorces
MMP9	F R	CCT TCC TTA TCG CCG ACA AG ACC GAC GCG CCT GTG TAC
MMP2	F R	ATC GCA GAT GCC TGG AAT G CTT TGG TTC TCC AGC TTC AGG TAA T
MMP3	F R	TTC GGC CCA TGC CTA TGC CCA GGG AGT GGC CAA TTT C
TIMP-1	F R	CGC AGC GAG GAG TTT CTC AT GCT GAG CTA AGC TCA GGC TGT
MCP-1	F R	CAT TGT GGC CAA GGA GAT CTG AGT GAG TGT TCA AGT CTT CGG AGT T
ICAM-1	F R	GGA GCT TCG TGT CCT GTA TGG ACA TTG GAC TCT GCT GGG AAT T
VCAM-1	F R	TTG GCT CAC AAT TAA GAA GTT TAA CAC GCA GGT ATT ATT AAG GAG GAT GCA A
23 kDa	F R	GCC TAC AAG AAA GTT TGC CTA TGA GCT GTT TCT TCT TCC GGT

Tableau II.4 : Amorces utilisées pour la PCR en temps réel.

- Buffer RT 5X

- dNTP mix

- Ribonuclease Inhibitor

- H₂O RNase free

3.2.2 Méthode

Un volume déterminé contenant 2 µg d'ARN de chaque échantillon est porté à 12 µl avec de l'eau RNase free. A ce volume est ajouté 1 µl de primer oligo (dT) et le mélange est incubé pendant 10 minutes à 65°C. Un mix de 7 µl contenant des inhibiteurs d'RNase, des déoxynucléotides, la transcriptase inverse et le tampon de l'enzyme (**Tableau II.3**) est ajouté dans chaque échantillon. Deux incubations, une de 30 minutes à 55°C et une de 5 minutes à 85°C suivent. Les échantillons sont finalement refroidis sur glace.

3.3 PCR en temps réel

3.3.1 Matériel

- Amorces : reverse et forward spécifique du gène à amplifier (Applied Biosystem, USA)

- H₂O distillée

- SYBR Green (Applied Biosystem, USA)

- Plaque 96 puits (Applied Biosystem, USA)

- Appareil PCR Science I 7900 HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystem, USA)

3.3.2 Méthode

L'ADNc est dilué 10X dans de l'eau distillée. Un mélange réactionnel est également préparé pour chaque gène d'intérêt étudié et pour le « house keeping gene » (**Tableau II.4**). 5 µl d'ADNc dilués sont déposés dans chaque puits, chaque échantillon est analysé en double. 20 µl du mix PCR des gènes d'intérêt sont également ajoutés dans les puits. Des blancs sont également préparés en remplaçant l'ADNc par de l'eau distillée. La plaque est ensuite recouverte d'un transparent autocollant, centrifugée brièvement pendant 1 minutes 15 à 700 rpm et placée dans la machine. Une courbe de dissociation est réalisée en fin d'amplification afin de vérifier la spécificité des amorces utilisées. Les « fold inductions » sont calculés pour chaque condition selon la série de calculs suivants :

a/ la moyenne des Ct est calculée pour chaque condition et chaque gène

b/ la moyenne des Ct obtenus pour le « house keeping gene » est soustraite de la moyenne obtenue pour le gène d'intérêt de la condition correspondante (Delta Ct)

c/ le Delta Ct de la condition contrôle est soustrait au Delta Ct des autres conditions (Delta Delta Ct)

d/ le fold d'induction de chaque condition est obtenu après avoir effectué le calcul : $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

Running gel (10 ml)	4,75 ml H ₂ O 100 µl de gélatine 2,5 ml de 1,5 M tris-HCl pH 8,8 2,5 ml d'acrylamide 100 µl de SDS 10% 50 µl d'APS 10% 10 µl de TEMED
Stacking gel (10 ml)	6,1 ml H ₂ O 2,5 ml de 0,5M Tris-HCl pH 6,8 1,3 ml d'acrylamide 100 µl de SDS 10% 50 µl d'APS 10% 10 µl de TEMED
Running Buffer 5X (1 l)	15 g Tris 72 g de glycine 5 g de SDS pH = 8,5
Solution A	0,1 g de bleu de bromophénol 8,8 g de sucrose 10 ml H ₂ O
Tampon d'échantillon	1,5 g de Tris 4 g de SDS 4 ml de la solution A 100 ml H ₂ O pH= 6,8
Tampon d'activation (1 l)	6,06 g de Tris 1,47 g de CaCl ₂ 2,92 g de NaCl 0,5 g de brij35 pH=7,6
Solution de décoloration	7,5% d'acide acétique 5% de méthanol 87,5% d'H ₂ O

Tableau II.5 : Compositions des solutions utilisées pour le zymogramme.

Inhibiteur	Référence
Inhibiteur MMP9	Cat # 444278 ; Calbiochem®
Inhibiteur MMP2	Cat # 444244 ; Calbiochem®
Inhibiteur MMP2/MMP9	Cat # 444249 ; Calbiochem®

Tableau II.6 : Inhibiteurs utilisés pour la détermination de la nature des enzymes révélées par zymographie.

4. Mesure de l'activité des métalloprotéinases : zymogramme

4.1 Matériel

- Running gel (**Tableau II.5**)
- Stacking gel (**Tableau II.5**)
- Gélatine (Sigma-Aldrich co., USA)
- Acrylamide (BioRad laboratories, USA)
- SDS (*Sodium Dodecylsulfate*) (MP Biomedicals, USA)
- Running buffer (**Tableau II.5**)
- Solution A (**Tableau II.5**)
- Tampon d'échantillon (**Tableau II.5**)
- Amicon Ultra Centrifugal ultracel 3K (Millipore, Ireland)
- Cuve minive (GE Healthcare, UK)
- Etalon Seebblue ® Plus 2 Prestained Standard (1X) (Invitrogen, USA)
- Triton X-100 à (Merck, Allemagne)
- Tampon d'activation (**Tableau II.5**)
- Inhibiteur MMP2, MMP9 et MMP2/MMP9 (**Tableau II.6**)
- Bleu de coomassie R250 à 2,5 % (Serva, Allemagne)
- Solution de décoloration (**Tableau II.5**)

4.2 Méthode

4.2.1 Préparation des gels

Dès que les plaques de verre sont assemblées formant un système étanche, le running gel est coulé. Ce dernier est recouvert d'isobutanol et est laissé polymériser 45 minutes. Après polymérisation, l'isobutanol est éliminé par de nombreux lavages avec de l'eau distillée. Le stacking gel est ensuite coulé au dessus du running gel et le peigne est introduit dans celui-ci. Durant la période de polymérisation de 45 minutes, les échantillons sont préparés.

4.2.2 Préparation des échantillons et migration

Les surnageants des différents milieux de culture cellulaire, récupérés lors de l'extraction d'ARN, sont re-centrifugés à 4000 rcf pendant une heure dans des Amicon (Ultra Centrifugal ultracel 3K) dans le but d'obtenir des échantillons concentrés. Ensuite, 15 µl de chaque échantillon concentré sont prélevés et 15 µl de tampon d'échantillon sont ajoutés à chaque échantillon concentré.

Une fois la polymérisation du stacking gel terminée, le peigne est enlevé et le gel est placé dans une cuve de migration dans laquelle du running buffer est versé. Finalement, 10 µl d'étalon de poids moléculaire et 20 µl de chaque échantillon sont déposés dans les puits et la migration à 4°C (la cuve est donc dans la glace) et à 85 Volt est lancée.

4.2.3 Traitement du gel

Après l'électrophorèse, les gels sont incubés dans 2,5 % de Triton X-100 pour échanger le SDS en Triton X-100 et pour restaurer l'activité enzymatique. Après cette étape, les gels sont incubés une nuit

à 37°C dans du tampon d'activation sous agitation, ce qui permet aux enzymes renaturées d'exercer leur activité enzymatique. Par la suite, les gels sont colorés avec du bleu de coomassie durant une heure sous agitation et puis, ils sont décolorés avec la solution de décoloration pendant 2 heures.

4.2.4 Révélation

Après les deux heures d'incubation des gels dans la solution de décoloration, les bandes d'activité des métalloprotéinases apparaissent comme des bandes claires derrière un fond bleu noir. L'activité des métalloprotéinases dépend de la quantité de métalloprotéinases présentes sur le zymogramme. La quantification des bandes a été effectuée après avoir scanné les gels, par l'utilisation du programme ImageQuant de General Electric.

5. Test de prolifération cellulaire : dosage MTT

Toutes les cellules métaboliquement actives incorporent du MTT. Ce dernier est clivé en son dérivé formazan qui induit la formation de cristaux insolubles en milieu aqueux et de coloration mauve. Celui-ci est ensuite dissous et son absorbance mesurée. Cette réaction est catalysée par une enzyme mitochondriale : la succinate déshydrogénase. Le dosage MTT permet donc de suivre la viabilité cellulaire et de manière indirecte la prolifération des cellules.

5.1 Méthode

- | | |
|---|--|
| • MTT bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium (Sigma #M2128, USA) | • Solution de lyse (SDS 30% dans H ₂ O + N,N-diméthyl-formamide 2:1 (v:v) pH=4,7) |
| • PBS | • Lecteur de plaque, microplate spectrophotometer (BioRad, USA) |
| • Solution MTT 2,5mg/ml dans PBS | |

5.2 Méthode

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits ou 12 puits à une densité de 208 000 cellules /puits ou de 183 000 cellules/puits respectivement. Après une mise au repos de 24 heures avec du milieu de culture SmBM sans supplément + 0,5 % de BSA, les cellules sont incubées avec du U46619, du 8-*iso*-PGF_{2α}, de l'IL-1β, de l'IL-18 ou du SIN-1. Dans certains puits, les cellules sont pré-incubées avec ou sans antagonistes du TP récepteur : du BM-520 ou du SQ29548. Après 24 heures d'incubation en présence de ces différentes molécules, 500 µl (pour les plaques 6 puits) ou 250 µl (pour les plaques 12 puits) de MTT sont ajoutés dans le milieu de chaque puits. Après 4 heures d'incubation à 37°C avec une atmosphère contenant 5% de CO₂, le milieu est décanté et les cellules sont lysées avec 0,5 ml de solution de lyse/puits pour la plaque 6 puits ou 250 µl pour la plaque 12 puits, sous agitation pendant 1 à 2 heures à 37°C. Enfin, l'absorbance des puits est lue à 570 nm.

6. Dosage de la concentration des protéines par la méthode de Folin

La méthode de Folin est une méthode d'analyse spectrométrique permettant de déterminer la concentration en protéines. La solution de Folin (complexe phospho molybdique phospho tungstique) se réduit en présence de protéines, ce qui donne une coloration bleue.

6.1 Matériel

- PBS
- NaOH 0,5 N et 2N
- Solution A : NaCO₃ 2% (100ml), Tartrate de Na et K 2% (1ml), CuSO₄ (1ml)
- BSA (2mg/ml)
- Tubes de Bradford (Kartels, Italie)
- Folin (Merck, Allemagne)
- H₂O distillée
- Spectrophotomètre Ultrospec 2100 pro (GE Healthcare, UK)

6.2 Méthode

Les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits à une raison de 9 000 cellules/puits. Après 24 heures de mise au repos avec du milieu de culture SmBM sans supplément + 0,5% de BSA, les cellules sont incubées avec du U46619, du 8-*iso*-PGF_{2α}, de l'IL-1β, de l'IL-18 ou du SIN-1. Dans certains puits, les cellules sont pré-incubées avec ou sans antagonistes du TP récepteur : du BM-520 ou du SQ29548. Après récolte des différents surnageants qui serviront pour un zymogramme, les cellules sont rincées avec 1 ml de PBS avant d'être lysées avec 200 µl/puits de NaOH 0,5 N pendant 30 minutes à température ambiante et sous agitation. Ensuite, les lysats sont récoltés et congelés à -20°C. Pour le dosage, 150 µl de lysat cellulaire ou de NaOH 0,5 N (blanc) ou de BSA en concentrations connues sont déposés dans les tubes à Bradford. 750 µl de solution A sont ajoutés dans les différents tubes. Après 10 minutes de réaction, 75 µl de Folin dilué deux fois dans de l'H₂O sont ajoutés dans chaque tube à des intervalles réguliers. Enfin, l'absorbance est lue avec le même intervalle de temps à 740 nm après 30 minutes.

7. Scratch test

Le scratch test est une technique permettant d'examiner la capacité migratoire des cellules.

7.1 Matériel

- PBS (Lonza, USA)
- Ethanol
- Grattoir cell scraper (SPL Life Sciences, Pays-Bas)
- Inhibiteur (**Tableau II.6**)

7.2 Méthode

Les cellules sontensemencées dans des T25 à une densité de 87 500 cellules/T25. Après 7 jours, la confluence des cellules est au maximum. Dès lors, les cellules sont mises au repos avec 3 ml de milieu SmBM sans supplément + 0,5% de BSA pendant 24 heures. Le lendemain, sous hotte, le racloir utilisé pour réaliser le scratch est tout d'abord rincé à l'éthanol puis au PBS. Ensuite, des rayures dans les T25 sont faites via l'utilisation de ce racloir. Le milieu de culture est par après décanté, puis les boîtes sont rincées avec du PBS pour enlever les dernières cellules détachées. Le milieu de stimulation est ensuite ajouté pendant 48 heures.

	Composants	Quantité (1 ml)	Détails pour la préparation
Tampon de lyse	10 mM Tris pH 7,5	1 ml	préparer séparément
	0,1 mM EDTA		préparer ensemble
	0,1 mM EGTA		
	0,5 % SDS		
	0,1 mM β -mercaptoéthanol	2 μ l	rajouter dans le tampon à la dernière minute
	PIC 25 X	40 μ l	
	PIB 25X	40 μ l	

	Composants
PIC (<i>Phosphate Inhibitor Cocktail</i>)	Na ₃ VO ₄ 25 nM
	PNPP 250
	β -glycérophosphate 250 nM
	NaF 125 nM
PIB (<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>)	1 tablette (complete inhibitor cocktail tablet 25X) diluée dans 1 ml H ₂ O distillée

Tableau II.7 : Composition du tampon de lyse pour l'extraction protéique totale.

8. Extraction des protéines membranaires pour Western Blot

8.1 Matériel

- Tampon de lyse (**Tableau II.7**)
- Grattoir cell scraper (SPL Life Sciences, Pays-Bas)
- PBS
- Centrifugeuse 4°C : Refrigerated Centrifuge 1-15 PK (Sigma, USA)
- Sonicateur vibracell (Sonics & Materials INC, USA)

8.2 Méthode

Après stimulation des cellules, les boîtes T25 sont placées sur glace, décantées, rincées 3 fois avec du PBS, puis re-décantées à l'aide d'une pipette pasteur. 400 µl de PBS sont ensuite déposés sur le tapis cellulaire de chaque boîte et les cellules sont raclées tout doucement et les cellules sont transférées dans des microtubes. Pour être certain que toutes les protéines membranaires aient été récoltées, la même manipulation est refaite avec 200 µl de PBS. Après centrifugation de ces lysats 5 minutes à 500 rcf, le PBS est retiré très délicatement et 70 µl de tampon de lyse sont ajoutés dans chaque eppendorf. Après 15 minutes d'incubation du tampon de lyse, les surnageants sont soniqués 3 fois 10 secondes. Les surnageants sont alors conservés à -70°C. Une fraction de chaque surnageant sera prélevée et servira pour le dosage de la concentration en protéines par la méthode de Pierce.

9. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Pierce

Le réactif Pierce permet de quantifier la concentration en protéines des différents extraits cellulaires. Cette concentration est déterminée par un dosage colorimétrique. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon.

9.1 Matériel

- Solution de Pierce (Thermo Scientific, USA)
- Etalon BSA 2 µg/µl
- Eau distillée
- Additif, Ionic Detergent Compatibility Reagent (Thermo Scientific, USA)
- Lecteur de plaque, microplate spectrophotometer (BioRad, USA)
- Plaque 96 puits (Greiner Bio-one, Allemagne)

9.2 Méthode

1 µl de chaque échantillon est ajouté dans les puits contenant 9 µl d'H₂O. La même quantité de tampon de lyse utilisé lors de l'extraction protéique est également mise dans un autre puits et servira de blanc. L'absorbance de ce tampon sera soustraite de celle de tous les échantillons. Après 5 minutes de réaction sous agitation, l'absorbance des échantillons est mesurée grâce à un lecteur de plaque à 660 nm. L'absorbance de concentrations connues en BSA est également mesurée et permettra de faire une courbe d'étalonnage. Etant donné que le tampon de lyse contient du SDS, un additif (0,05g/puits pour 150µl de Pierce) est ajouté dans le Pierce avant que ce dernier soit déposé dans les différents

Gel buffer (200 ml)	36,3 g de Tris 0,8 g SDS pH = 8,9
Spacer gel buffer (200 ml)	10,2 g de Tris 0,8 g SDS pH = 6,8
Running buffer 10 X (1000 ml)	30 g de Tris 140 g de glycine 10 g SDS
Blotting buffer (5000 ml)	24 g de Tris 115 g de glycine 1 L de méthanol
Bleu de charge 5X	10 ml de spacer buffer 10 ml de SDS 20 % 5 ml de β-mercaptoéthanol 10 ml de glycérol 17,5 mg de bleu de bromophénol
TBS 10 x (1 l)	24,22 g de Tris 80,06 g de NaCl pH = 7,6

Gel séparateur d'acrylamide	3,75 ml de Gel buffer 5 ml d'acrylamide 5,5 ml H ₂ O 750 µl d'APS 1% 15 µl de TEMED
Gel concentrateur	1,875 ml de Spacer gel buffer 0,75 ml d'acrylamide 4,125 ml H ₂ O 750 µl d'APS 1% 15 µl de TEMED

Tableau II.8 : Composition des différentes solutions utilisées lors du Western Blot.

Anticorps primaire	Référence	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
Anti-ICAM-1	sc-7891; Santa-Cruz Biotechnology	1 000 X	Anti-rabbit	7 000 X
Anti-Tubuline	T5168; Sigma	10 000 X	Anti-souris	20 000X
Anti-MMP2	sc-13594; Santa-Cruz Biotechnology	500 X	Anti-souris couplé à la peroxydase	20 000 X

Figure II.9 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les analyses en Western-Blot.

puits. L'additif a pour but de bloquer le rôle du détergent ionique et donc d'empêcher ce dernier de réagir avec le réactif le Pierce.

10. Western Blot

Le Western Blot est une technique permettant d'analyser de manière semi-quantitative l'abondance d'une protéine. Cette technique se déroule en plusieurs étapes. Les protéines des différents échantillons vont tout d'abord subir une séparation par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) avant d'être transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylDièneFluoride). La protéine d'intérêt est finalement mise en évidence via l'utilisation d'un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt.

10.1 Matériel

- Gel buffer (**Tableau II.8**)
- Acrylamide (BioRad Laboratories, USA)
- Spacer gel buffer (**Tableau II.8**)
- Running buffer (**Tableau II.8**)
- Bleu de charge 5X (**Tableau II.8**)
- Blotting buffer (**Tableau II.8**)
- Gel sépareur d'acrylamide (**Tableau II.8**)
- Gel concentrateur (**Tableau II.8**)
- Bloc chauffant
- Cuves minive (GE Healthcare, UK)
- Papier whatman
- Membrane de PVDF, Immobilon Transfer Membrane (Millipore, Ireland)
- Anticorps (**Tableau II. 9**)
- Etalon Seebblue plus (Invitrogen, USA)
- Tween (Merck, Allemagne)
- Agent bloquant Licor (Westburg, Hollande)
- ECL blocking agent (GE Healthcare, UK)
- PBS
- TBS (**Tableau II.8**)
- TEMED (GE Healthcare, UK)
- APS, Ammonium PerSulfate (GE Healthcare, UK)

10.2 Méthode

10.2.1 Préparation des gels

Des gels d'acrylamide de 10 % ont été réalisés. Dès que les deux plaques de verre sont assemblées formant un système étanche, le running gel est préparé et coulé. Ce dernier est recouvert d'isobutanol saturé et est laissé polymériser pendant 1 heure. Après la polymérisation, l'isobutanol est retiré par d'abondants lavages avec de l'eau distillée. Le stacking gel est ensuite coulé au dessus du running gel et le peigne est déposé dans celui-ci. Durant la période de polymérisation d'une heure, les échantillons sont préparés.

10.2.2 Préparation des échantillons et migration

Les échantillons sont préparés dans des eppendorfs et ont un volume final de 35 µl. Chaque échantillon comprend 25 µg de protéines ainsi que 7 µl de bleu de charge 5X. Pour porter les échantillons à un même volume du spacer gel buffer est ajouté. Avant d'être chargés, les échantillons sont fermés avec des clips et dénaturés par un passage de 4 minutes dans un bloc chauffant à 100 °C. Une brève centrifugation (2 minutes à 13 000 rpm) a ensuite lieu. Dès que la polymérisation du stacking gel est terminée, le peigne est enlevé et le gel est placé dans la cuve de migration dans laquelle du running buffer est ensuite ajouté. Finalement, 3 µl d'étalon de poids moléculaire ou 35 µl de chaque échantillon sont déposés dans les puits. La migration des échantillons a lieu à travers le gel à un ampérage de 160 mA, à 200 Volt pendant 1 heure.

10.2.2 Transfert sur membrane

Dès que la migration est terminée, le gel est démoulé et les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidènefluoride (PVDF) préalablement activée par le méthanol. Un montage est « sandwich », éponge-papier whatman-membrane-gel-papier whatman-éponge inhibé de blotting buffer, est réalisé. Ce transfert semi-sec se déroule pendant 2 heures à 150 mA.

A/ Pour LICOR

10.2.3 Traitement de la membrane

Le transfert terminé, le montage est démoulé et la membrane est bloquée avec l'agent bloquant Licor dilué 2 fois pendant une nuit. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire pendant une heure à température ambiante. Après 4 rinçages avec du PBS + 0,1 % Tween, la membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire pendant une heure, à température ambiante et à l'obscurité. Finalement, 4 rinçages de 5 minutes avec du PBS + 0,1 % de Tween et 2 rinçages avec du PBS sont effectués et la membrane est séchée 30 minutes à 37 °C avant d'être scannée.

10.2.4 Révélation

La technique de révélation utilisée pour détecter la présence des protéines d'intérêt est la fluorescence. Dès que la membrane est scannée, on peut observer si les protéines d'intérêt sont présentes grâce à la fluorescence émise. La quantification des bandes a été effectuée par l'utilisation du programme Odyssey Licor de Westburg.

B/ Pour Western Chemoluminescence

10.2.4 Traitement de la membrane

Le transfert terminé, le montage est démoulé et la membrane est incubée en présence de la solution de blocage (TBS-Tween 0,1% contenant 2 % d'agent bloquant) toute la nuit à 4°C. Après le blocage, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire pendant 1 heure à température ambiante. Après 3 lavages aux TBS-Tween 0,1 % de 15 minutes, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à une HRP pendant 1 heure.

10.2.5 Révélation

La technique de révélation utilisée pour détecter la présence des protéines d'intérêt est la chemoluminescence. La membrane est recouverte d'un mélange de deux substrats formant ainsi la solution de révélation. Le substrat ECL dégradé par la HRP produit de la lumière qui est détecté sur un film photographique.

11. Filtration de la BSA

Une chromatographie d'affinité sur une colonne de centrifugation a permis de filtrer la BSA. La BSA et les protéines liées à la BSA se collent à la colonne tandis que les autres protéines n'ayant pas de BSA sont récupérées dans le filtrat. Nous avons suivi la procédure donnée par la firme.

11.1 Matériel

- 10 mM phosphate pH 7,4
- Aurum™ Affi-Gel® Blue Mini Kits and Columns (BioRad Laboratories, USA)

12. Coloration des protéines présentes dans un gel

12.1 Matériel

- Gel Code® Blue G250 (Thermo Scientific, USA)

12.2 Méthode

Dès que la migration des échantillons à travers le gel est terminée, le gel est démoulé et lavé 2 fois pendant 15 minutes avec de l'eau pour enlever le SDS. Ensuite, le gel est incubé dans la solution de coloration pendant 2 heures. Après l'incubation, le gel est finalement rincé dans de l'eau toute la nuit.

III. Résultats

III. Résultats

Les AoSMCs ont été incubées en présence d'agonistes du récepteur TP et l'effet de ces molécules sur différentes fonctions de ces cellules a été étudié. Différents contrôles positifs ont été utilisés lors de ces expériences. Le premier contrôle positif est l'IL-1 β , une cytokine pro-inflammatoire qui est utilisée pour mimer les conditions pro-inflammatoires qui sont observées dans les plaques athéromateuses. Le second contrôle positif est l'IL-18, une cytokine pro-inflammatoire et pro-athérogénique qui stimule la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses. La migration des cellules musculaires lisses est impliquée dans le remodelage pathologique de la paroi des vaisseaux lors de l'athérosclérose. L'IL-18 stimule aussi la sécrétion de MMP2 et MMP9 ce qui conduit à la migration des cellules musculaires lisses (Chandrasekar, Mummidi et al. 2006). Le dernier contrôle positif est le SIN-1 (3-morpholinosydnone N-éthylcarbamide) qui est une molécule libérant du peroxy-nitrite. Le SIN-1 est utilisé pour mimer le stress oxydatif qui est observé dans les plaques athéromateuses.

1. Caractérisation des effets des agonistes du récepteur TP sur la production de MMPs par les AoSMCs

1.1 Effets des agonistes sur l'abondance de l'ARNm de gènes impliqués dans la production MMPs

Au sein des plaques athéromateuses, de nombreuses MMPs sont produites par les cellules musculaires lisses. Ces MMPs interviennent dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Elles influencent aussi la stabilité de la plaque athéromateuse. Au sein de la plaque athéromateuse, différentes MMPs comme MMP2 et MMP9 (des gélatinases), MMP3 (une stromélysine) et MMP1 (une collagénase) sont détectées. MMP2 et MMP9 sont considérées comme les MMPs les plus abondantes au niveau de la plaque.

Nous avons voulu examiner le niveau d'expression d'ARNm des gènes encodant ces protéases MMPs et l'influence possible des agonistes et des antagonistes du récepteur TP sur cette expression. Cette analyse a été réalisée par RT-PCR en temps réel dans trois expériences indépendantes.

Nous avons utilisé comme agonistes du récepteur TP, la molécule U46619 à une concentration de 1 μ M et le 8-iso-PGF_{2 α} à une concentration de 50 μ M et comme antagonistes du récepteur TP, le BM-520 à une concentration de 1 μ M et le SQ29548 à une concentration de 1 μ M. Des contrôles positifs tels que l'IL-1 β à 3ng/ml, l'IL-18 à 10ng/ml et le SIN-1 à 0,5 mM ont aussi été réalisés.

La première MMP analysée est la MMP2 (**Figure III.1**). L'IL-1 β augmente le niveau d'expression des ARNm codant pour la MMP2 tandis que l'IL-18 et le SIN-1 ne semblent pas influencer l'expression de MMP2. Le U46619 et le 8-iso-PGF_{2 α} augmentent le niveau d'expression ARNm encodant la MMP2 de 1,4 et de 1,5 fois, respectivement. Une pré-

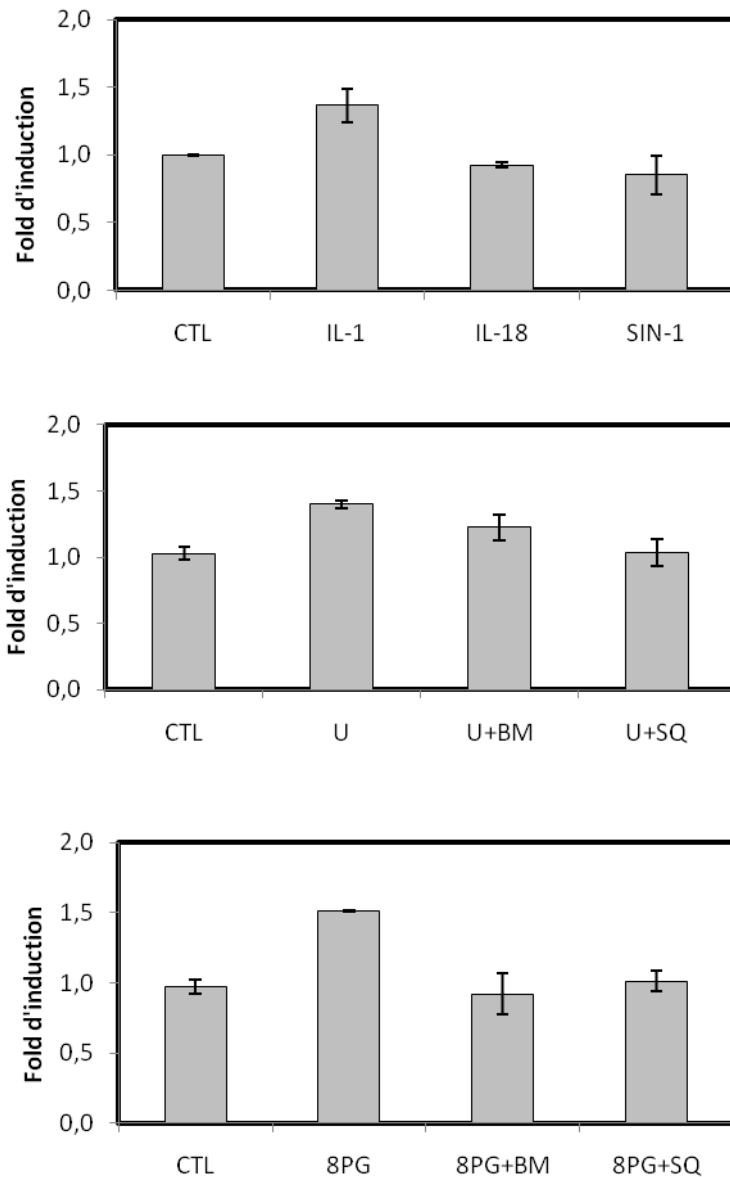


Figure III.1 : Effets des agonistes du récepteur TP sur l'abondance de l'ARNm de la MMP2. Les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence des agonistes U46619 (U) ou 8-iso-PGF_{2α} (8PG) avec ou sans pré-incubation d'une heure des antagonistes SQ29548 (SQ) et BM-520 (BM). Différents contrôles positifs sont utilisés : IL-1β (IL-1), IL-18 et SIN-1. Après l'incubation, l'ARN total est extrait et retranscrit. L'ARNm du gène MMP2 a, par après, été amplifié et quantifié par PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés en fold d'induction, en tant que moyenne ± n écart-type (n=3).

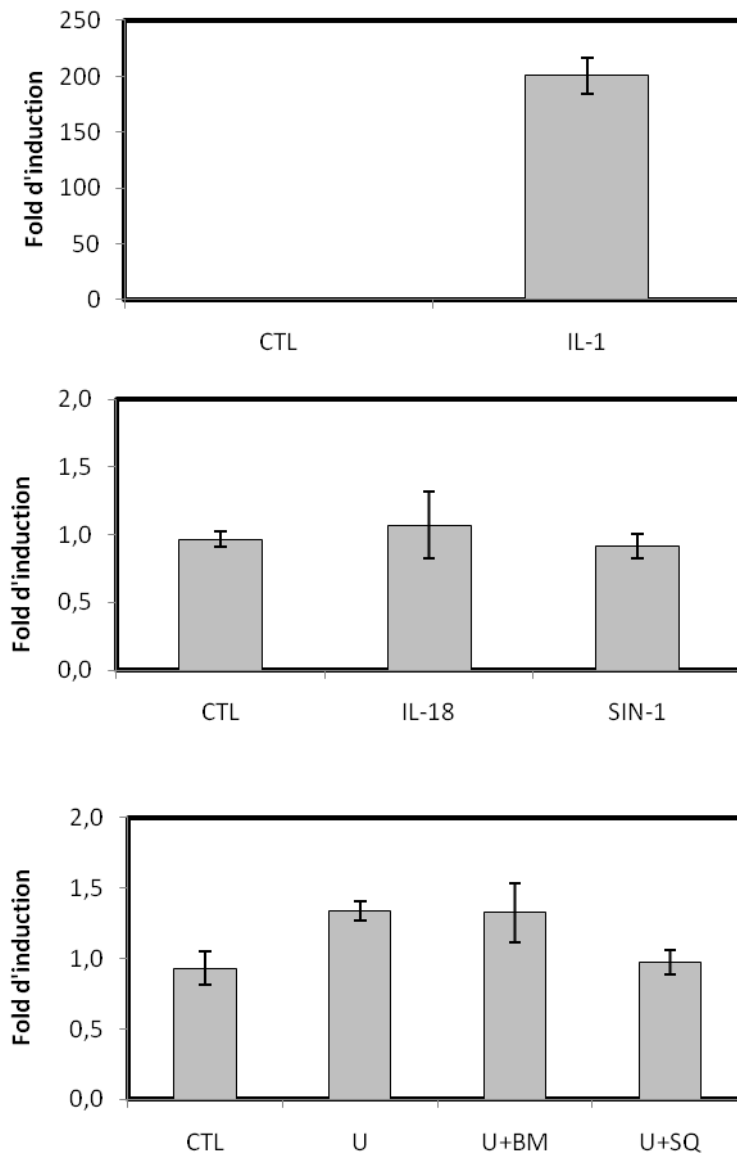


Figure III.2 : Effets des agonistes du récepteur TP sur l'abondance de l'ARNm de la MMP3. Les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence des agonistes U46619 (U) ou 8-iso-PGF_{2α} (8PG) avec ou sans pré-incubation d'une heure des antagonistes SQ29548 (SQ) et BM-520 (BM). Différents contrôles positifs sont utilisés : IL-1 β (IL-1), IL-18 et SIN-1. Après l'incubation, l'ARN total est extrait et retranscrit. L'ARNm du gène MMP3 a, par après, été amplifié et quantifié par PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés en fold d'induction, en tant que moyenne \pm n écart-type (n=3).

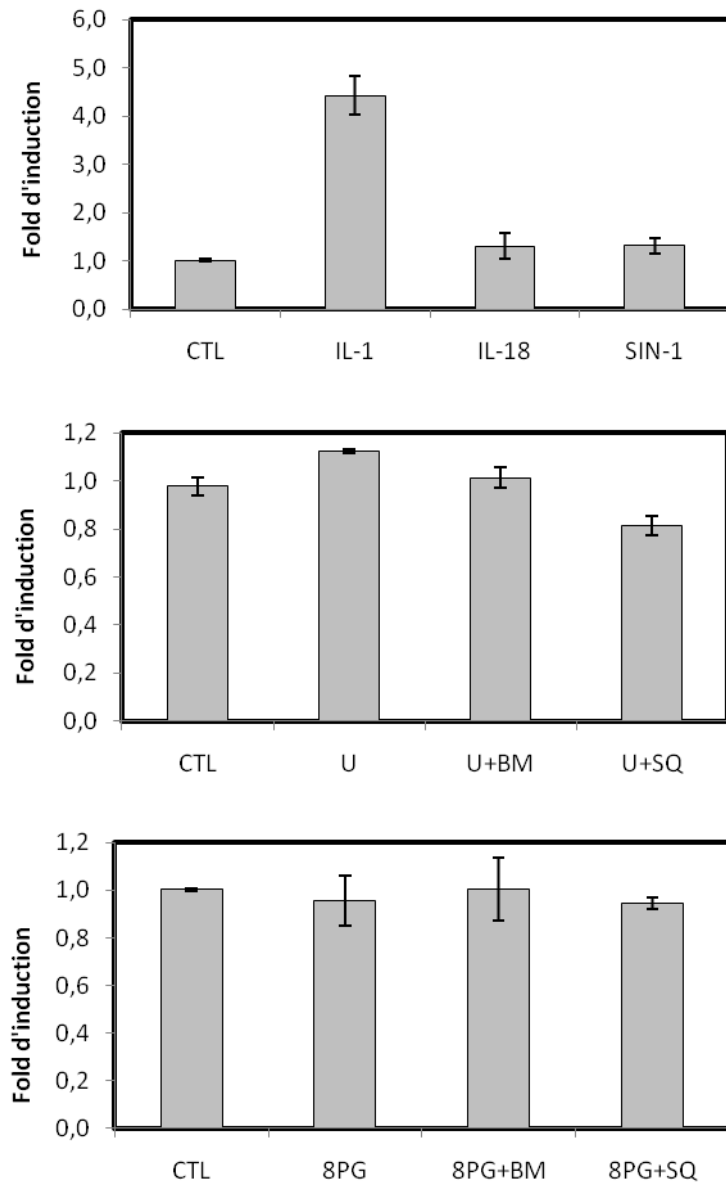


Figure III.3 : Effets des agonistes du récepteur TP sur l'abondance de l'ARNm de la MMP1. Les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence des agonistes U46619 (U) ou 8-iso-PGF_{2α} (8PG) avec ou sans pré-incubation d'une heure des antagonistes SQ29548 (SQ) et BM-520 (BM). Différents contrôles positifs sont utilisés : IL-1 β (IL-1), IL-18 et SIN-1. Après l'incubation, l'ARN total est extrait et retranscrit. L'ARNm du gène MMP1 a, par la suite, été amplifié et quantifié par PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés en fold d'induction, en tant que moyenne \pm n écart-type (n=3).

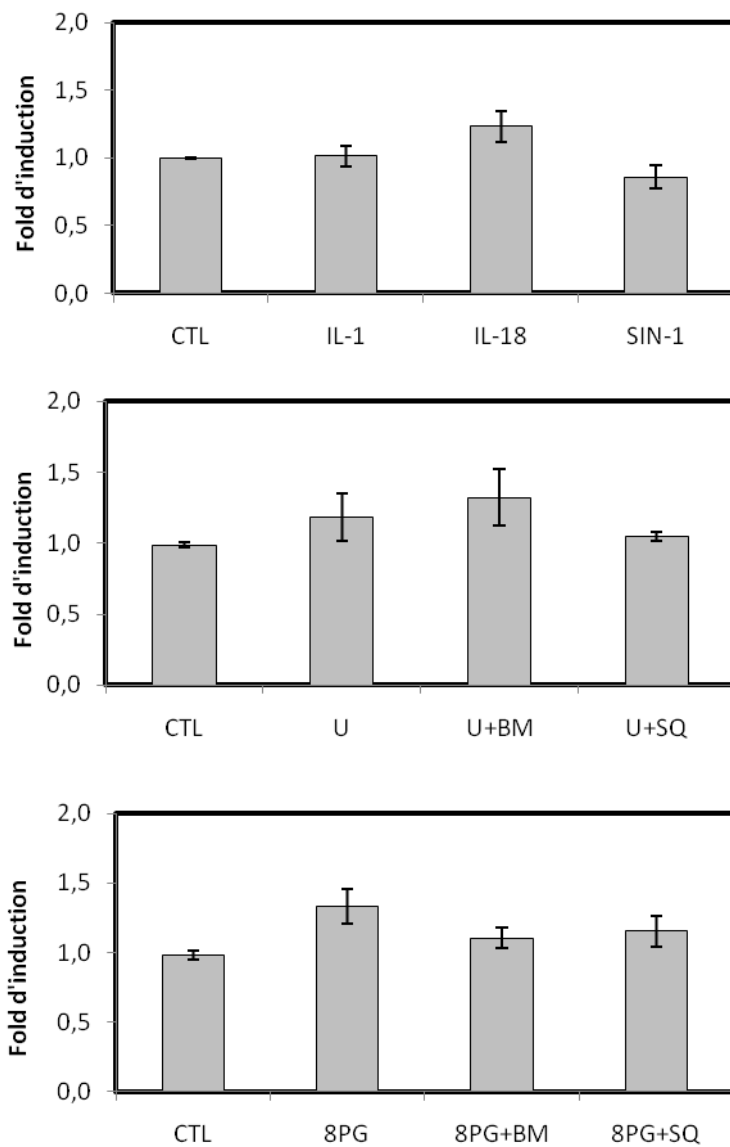


Figure III.4 : Effets des agonistes du récepteur TP sur l'abondance de l'ARNm de la TIMP-1. Les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence des agonistes U46619 (U) ou 8-iso-PGF_{2α} (8PG) avec ou sans pré-incubation d'une heure des antagonistes SQ29548 (SQ) et BM-520 (BM). Différents contrôles positifs sont utilisés : IL-1β (IL-1), IL-18 et SIN-1. Après l'incubation, l'ARN total est extrait et retranscrit. L'ARNm du gène TIMP-1 a, par après, été amplifié et quantifié par PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés en fold d'induction, en tant que moyenne ± n écart-type (n=3).

incubation avec les antagonistes du récepteur TP empêche l'action des agonistes du récepteur TP. Le niveau d'expression du gène retombe alors au niveau mesuré dans les cellules contrôles

La seconde MMP à avoir été analysée est la MMP9. Cependant, les AoSMCs ne semblent pas exprimer d'ARNm encodant la MMP9. En effet, le cycle threshold détecté est plus haut que 40. Nous avons vérifié si les amorces MMP9 utilisées étaient adéquates en utilisant de l'ARN provenant de kératinocytes connus pour exprimer MMP9. Nous détectons bien de l'ARNm encodant la MMP9 dans les extraits de ces cellules. Nous avons donc conclu que les AoSMCs n'exprimaient pas de MMP9.

La troisième MMP analysée est la MMP3 (**Figure III.2**). Une induction marquée de son expression est observée en présence d'IL-1 β , de plus de 200 fois. L'IL-18 et le SIN-1 ne semblent pas influencer l'expression de MMP3. L'agoniste U46619 provoque une induction de 1,3 fois alors que 8-iso-PGF_{2 α} n'exprime pas d'ARNm encodant la MMP3. En effet, le cycle threshold détecté est plus haut que 35, ce qui suggère que les cellules mises en présence de 8-iso-PGF_{2 α} n'expriment pas de MMP3. L'antagoniste SQ29548, pré-incubé une heure avant l'agoniste U46619, réduit le niveau d'expression de MMP3. Cependant, lorsque les cellules sont incubées en présence de U46619+BM-520, le niveau d'expression d'ARNm encodant la MMP3 est similaire à celui des cellules incubées en présence de U46619 seul.

La dernière MMP analysée est la MMP1 (**Figure III.3**). L'IL-1 β , l'IL-18 et le SIN-1 induisent une augmentation du niveau d'ARNm encodant la MMP1 de 4,4, de 1,3 et de 1,3 fois, respectivement. Le U46619 induit une faible augmentation alors que le 8-iso-PGF_{2 α} ne semble pas influencer l'expression de MMP1. Une pré-incubation avec des antagonistes du récepteur TP réduit le niveau d'expression de MMP1 induite par le U46619.

Des inhibiteurs de MMPs ont aussi été mis en évidence dans les plaques athéromateuses. Ces inhibiteurs comme TIMP-1 peuvent inhiber les MMPs. Il est donc intéressant d'examiner si les AoSMCs produisent des ARNm codant pour ces inhibiteurs. L'IL-1 β et le SIN-1 n'influencent pas le niveau d'ARNm encodant le TIMP-1 alors que l'IL-18 induit une faible augmentation. Le U46619 et le 8-iso-PGF_{2 α} augmentent le niveau d'expression de TIMP-1 de 1,2 et de 1,3 fois, respectivement. Une pré-incubation avec l'antagoniste du récepteur TP SQ29548 diminue le niveau d'expression de TIMP-1. Cependant, lorsque les cellules sont incubées en présence de U46619+BM-520, le niveau d'expression de TIMP-1 augmente légèrement comparé à celui lorsque les cellules sont incubées en présence de U46619 (**Figure III.4**).

En résumé, cette analyse du niveau d'expression des gènes encodant différentes MMPs indique que le U46619 augmente l'expression des gènes encodant la MMP2, MMP3 et MMP1. Le 8-iso-PGF_{2 α} n'influence l'expression que d'un gène : MMP2. De manière générale, les antagonistes du récepteur TP diminuent l'effet des agonistes du récepteur TP sur l'expression des MMPs.

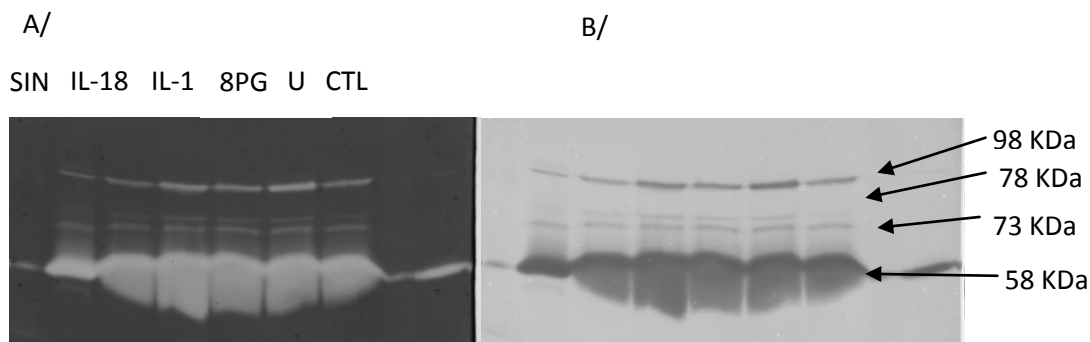


Figure III.5 : Effet des agonistes U46619 (U) et 8-iso-PGF_{2α} (8PG), de l'IL-1β (IL-1), de l'IL-18 et du SIN-1 (SIN) sur l'activité enzymatique des MMPs. Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec les agonistes du récepteur TP le U46619 à 1 μM, le 8-iso-PGF_{2α} à 50 μM, l'IL-1β à 3 ng/ml, l'IL-18 à 10 ng/ml et le SIN-1 à 0,5 mM. Après 24 heures d'incubation, les surnageants sont collectés, concentrés et analysés par zymographie. A : zymogramme, B : zymogramme identique au zymogramme de la figure A mais les couleurs sont inversées.

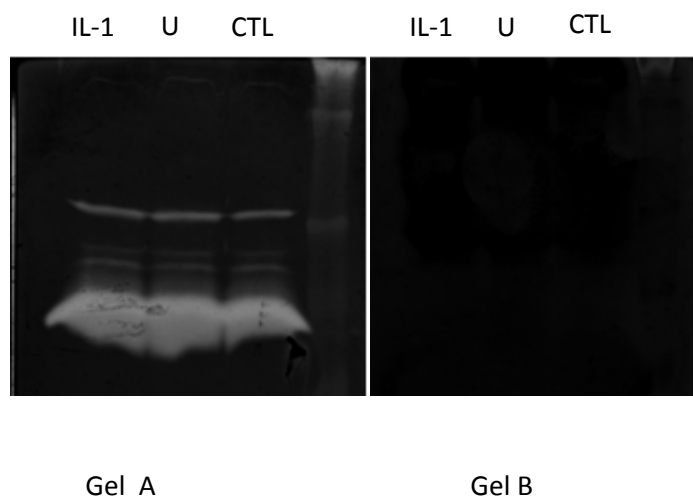


Figure III.6 : Effets de l'EDTA sur l'activité des enzymes révélées par zymographie. Les cellules sont incubées 24 heures avec l'agoniste du récepteur TP le U46619 (U) à 1 μM et l'IL-1β (IL-1) à 3 ng/ml. Après incubation, les surnageants sont récupérés, concentrés et analysés par zymographie. Durant l'expérience, le gel A est mis dans du tampon d'activation sans EDTA tandis que le gel B est mis dans du tampon d'activation avec de l'EDTA à 20 mM.

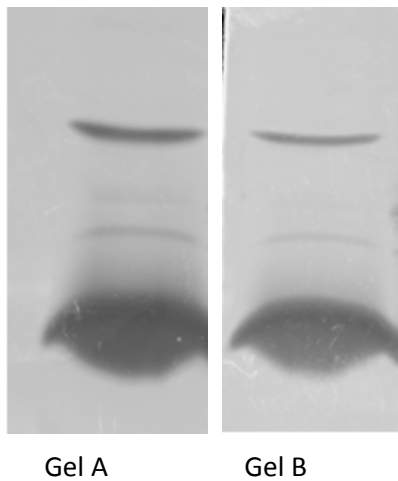


Figure III.7 : Effets d'un inhibiteur de la MMPs sur l'activité des enzymes révélées par zymographie. Les cellules sont incubées 24 heures avec un agoniste du récepteur TP le U46619 à 1 μ M. Après incubation, les surnageants sont récupérés, concentrés et analysés par zymographie. Durant l'expérience, le gel A est mis dans du tampon d'activation sans inhibiteur de MMP9 tandis que le gel B est mis dans du tampon d'activation avec l'inhibiteur de MMP9 à une concentration de 200 μ M.

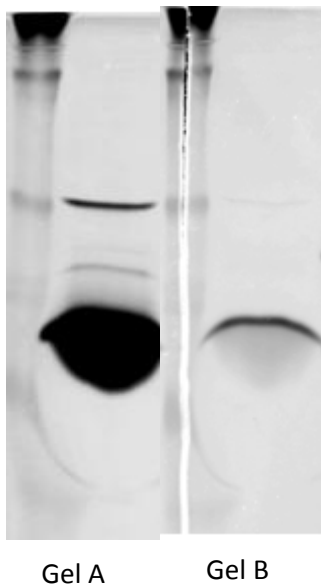


Figure III.8 : Effets d'un inhibiteur de la MMPs sur l'activité des enzymes révélées par zymographie. Les cellules sont incubées 24 heures avec un agoniste du récepteur TP le U46619 à 1 μ M. Après incubation, les surnageants sont récupérés, concentrés et analysés par zymographie. Durant l'expérience, le gel A est mis dans du tampon d'activation sans inhibiteur de MMP2 tandis que le gel B est mis dans du tampon d'activation avec l'inhibiteur de MMP2 à une concentration de 2 mM.

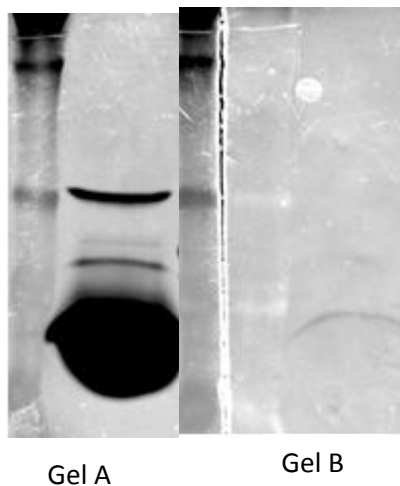


Figure III.9 : Effets d'un inhibiteur de la MMPs sur l'activité des enzymes révélées par zymographie. Les cellules sont incubées 24 heures avec un agoniste du récepteur TP le U46619 à 1 μ M. Après incubation, les surnageants sont récupérés, concentrés et analysés par zymographie. Durant l'expérience, le gel A est mis dans du tampon d'activation sans inhibiteur combiné de MMP9/MMP2 tandis que le gel B est mis dans du tampon d'activation avec l'inhibiteur combiné de MMP9/MMP2 à une concentration de 25 μ M.

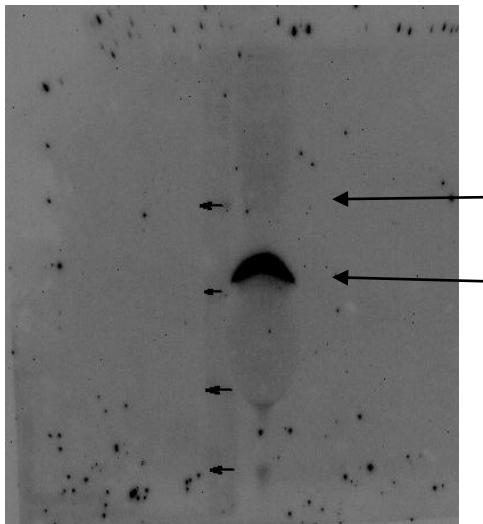


Figure III.10 : Expression de MMP2. Les cellules sont incubées 24 heures avec un agoniste du récepteur TP le U46619 à 1 μ M. Après incubation, les surnageants sont récupérés, concentrés. Après électrophorèse et transfert des protéines sur une membrane, les MMP2 sont révélées à l'aide d'anticorps spécifiques.

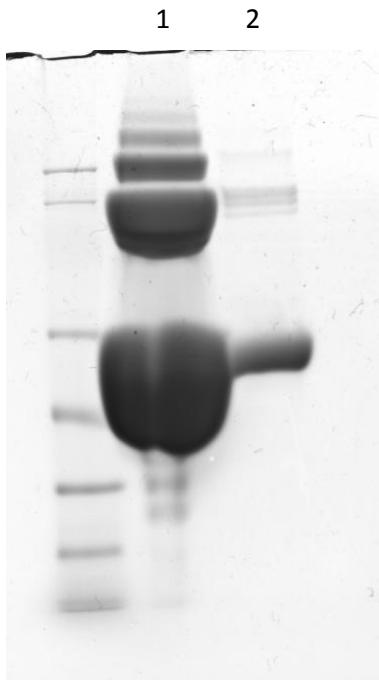


Figure III.11 : Effet de la BSA sur la migration des protéines dans un gel. Les cellules sont incubées 24 heures avec un agoniste du récepteur TP le U46619 à 1 μ M. Après incubation, les surnageants sont récupérés, concentrés et filtrés pour éliminer la BSA. Après électrophorèse, les différentes protéines sont colorées au bleu. L'échantillon 1 correspond à un échantillon sans filtration de la BSA tandis que l'échantillon 2 correspond au même échantillon que l'échantillon 1 ayant eu une filtration de la BSA.

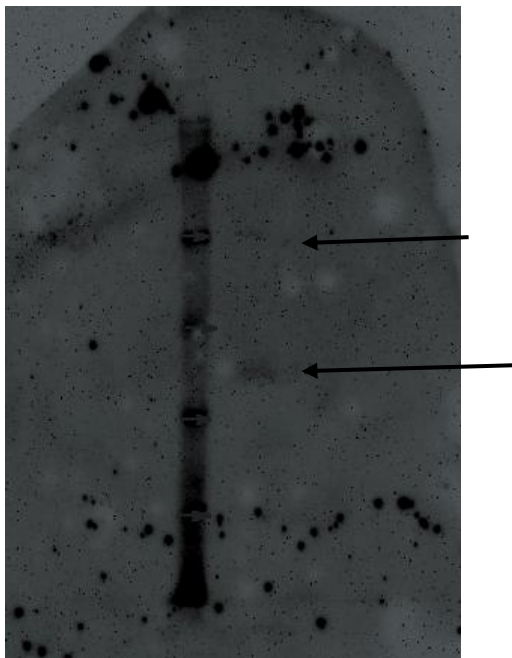


Figure III.12 : Expression de MMP2. Les cellules sont incubées 24 heures avec un agoniste du récepteur TP le U46619 à 1 μ M. Après incubation, les surnageants sont récupérés, concentrés et filtrés. Après électrophorèse et transfert des protéines sur une membrane, les MMP2 sont révélées à l'aide d'anticorps spécifiques.

1.2 Mesure de l'activité enzymatique des MMPs

Etant donné que les agonistes du récepteur TP augmentent le niveau d'expression des ARNm encodant différents MMPs, il était intéressant de suivre l'expression protéique de ces protéases et de mesurer l'activité des MMPs secrétées par les cellules AoSMCs. Les surnageants des différents milieux de culture cellulaire ont ainsi été récupérés pour réaliser un zymogramme.

1.2.1 Identification des enzymes révélées par zymographie

Comme le montre la **Figure III.5**, lorsque les milieux de culture des AoSMCs sont analysés par zymogramme différentes bandes claires (98 kDa, 78 kDa, 73 kDa et 58 kDa) sont observées sur le zymogramme suggérant l'activité de différentes MMPs.

Pour confirmer que ces différentes bandes correspondent à des MMPs, nous avons utilisé l'EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), un chélateur qui séquestre les ions magnésium des MMPs requis pour leur activité et qui bloque donc l'activité des MMPs. Il est ajouté dans le tampon d'activation. Les mêmes échantillons sont déposés sur les deux gels. Comme le montre la **Figure III.6**, les différentes bandes présentes sur le premier gel sont détectées tandis que sur le second gel, aucune bande n'est observée. Ces résultats indiquent que toutes les bandes correspondent à des MMPs actives.

Pour identifier les différentes bandes, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de la MMP9 et de la MMP2 et un inhibiteur non spécifique MMP2/MMP9. Ces inhibiteurs sont ajoutés dans le tampon d'activation. Les mêmes échantillons sont déposés sur les deux gels. Comme le montre la **Figure III.7**, les différentes bandes présentes sur le premier gel sont détectées et sur le second gel, ces différentes bandes, même si elles sont moins intenses, sont toujours présentes. Cette diminution d'intensité est probablement due à une inhibition non spécifique. Ces résultats suggèrent qu'aucune de ces bandes ne correspond à une MMP9. Par ailleurs, lorsque le gel est incubé en présence de l'inhibiteur MMP2, toutes les bandes disparaissent (**Figure III.8**). Ces résultats suggèrent que toutes les bandes correspondent à différentes formes de la MMP2 qui pourrait être seule ou en complexe avec d'autres protéines. Au sein d'un zymogramme, différentes formes de MMP2 (la pro-MMP2, la MMP2 intermédiaire et la MMP2 fully active) peuvent être détectées. Enfin, lorsque le gel est incubé en présence de l'inhibiteur combiné MMP2/MMP9, toutes les bandes disparaissent (**Figure III.9**). Ce dernier résultat suggère que l'inhibiteur MMP2 inhibe l'activité de toutes les MMPs présentes sur le gel.

Pour vérifier que les protéines présentes au niveau de ces bandes correspondent bien à la MMP2, un western-blot a été réalisé en utilisant l'ECL « advanced ». L'ECL « advanced » est une technique permettant de détecter de très faibles quantités de protéines. Comme le montre la **Figure III.10**, la bande à 58 kDa est reconnue par l'anticorps anti-MMP2. Il faut cependant noter que même si cette bande a la même morphologie que celle présente sur un zymogramme, elle ne migre pas au même poids moléculaire apparent (74 kDa). Cette différence de poids moléculaire est certainement due à la présence de la gélatine dans le

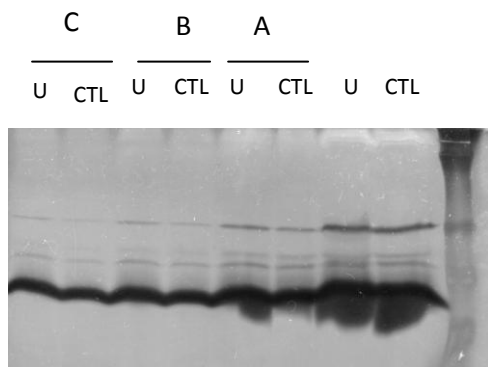


Figure III.13 : Effet du U46619 (U) sur l'activité enzymatique des MMPs. Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec les agonistes du récepteur TP le U44619 à 1 μ M. Après 24 heures d'incubation, les surnageants sont collectés, concentrés et mis dans le gel contenant de la gélatine. Les échantillons sont dilués 2X (A), 4X (B) et 6X (C).

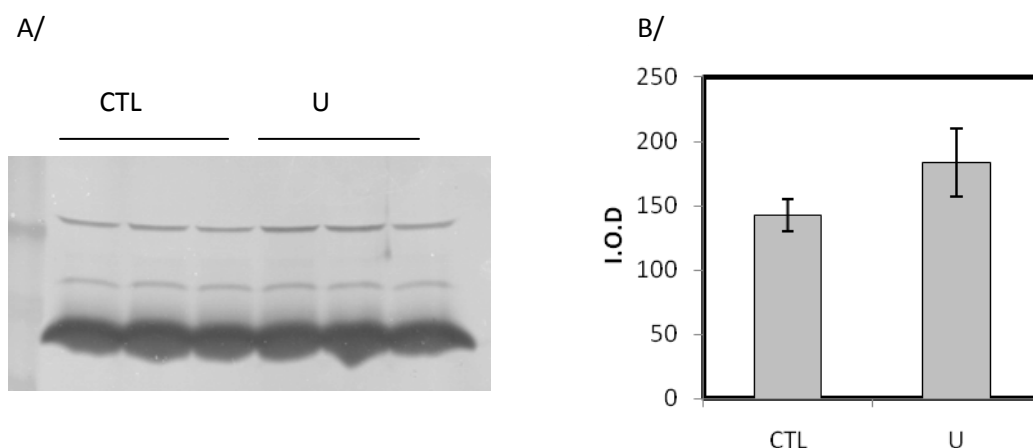


Figure III.14 : Effet du U46619 (U) sur l'activité enzymatique des MMPs. Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec l'agoniste du récepteur TP : le U44619 à 1 μ M. Après 24 heures d'incubation, les surnageant sont collectés, concentrés et mis dans le gel contenant de la gélatine. Trois échantillons provenant de trois expériences indépendantes ont été déposés sur le gel. A : zymogramme, B : quantification de la bande à 98 kDa via l'utilisation du programme ImageQuant de General Electric.

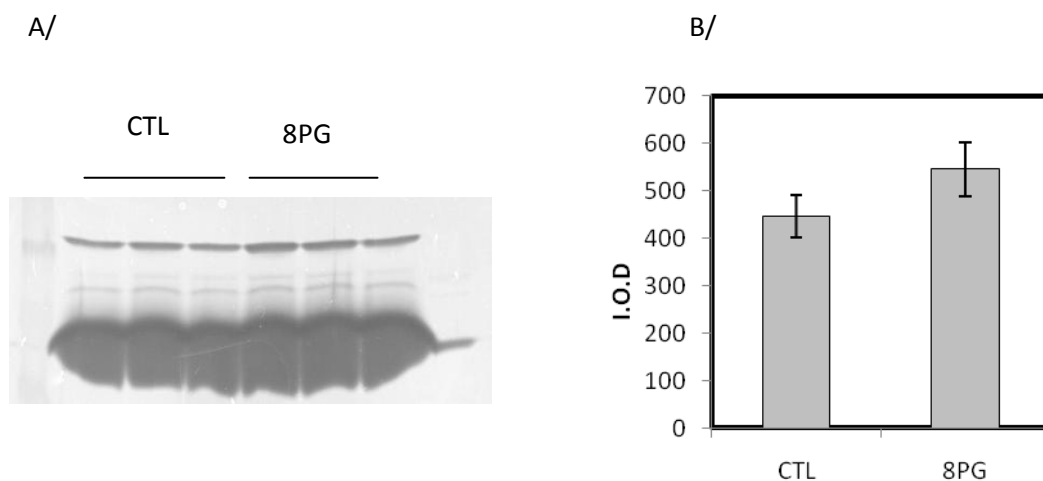


Figure III.15 : Effet du 8-iso-PGF_{2α} (8PG) sur l'activité enzymatique des MMPs. Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec l'agoniste du récepteur TP : le 8-iso-PGF_{2α} à 50 μ M. Après 24 heures d'incubation, les surnageants sont collectés, concentrés et mis dans le gel contenant de la gélatine. Trois échantillons provenant de trois expériences indépendantes ont été déposés sur le gel. A : zymogramme, B : quantification de la bande à 98 kDa via l'utilisation du programme ImageQuant de General Electric.

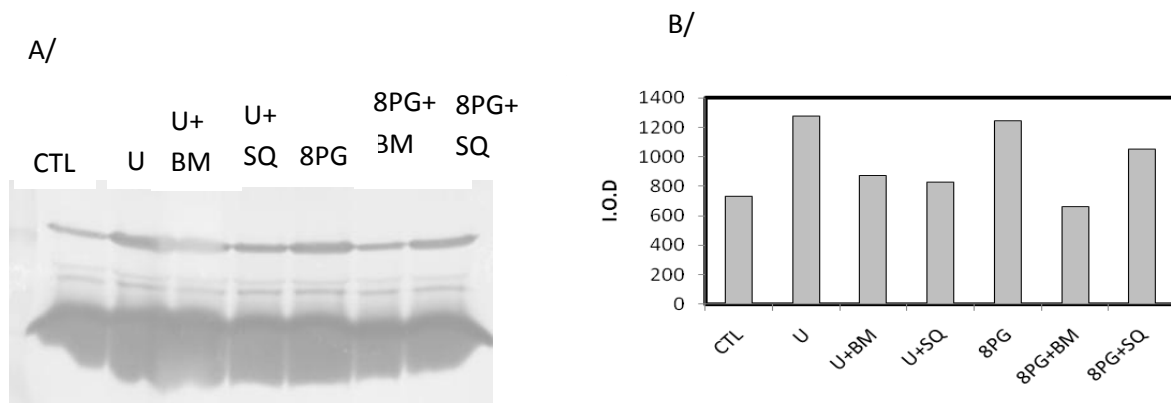


Figure III.16 : Effet des agonistes U46619 (U) et 8-iso-PGF_{2α} (8PG) sur l'activité enzymatique des MMPs. Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec les agonistes du récepteur TP le U46619 à 1 μ M, le 8-iso-PGF_{2α} à 50 μ M avec ou sans antagonistes du récepteur TP le BM-520 (BM) à 1 μ M ou le SQ29548 (SQ) à 1 μ M. Après 24 heures d'incubation, les surnageants sont collectés, concentrés et mis dans le gel contenant de la gélatine. A : zymogramme, B : quantification de la bande à 98 kDa via l'utilisation du programme ImageQuant de General Electric.

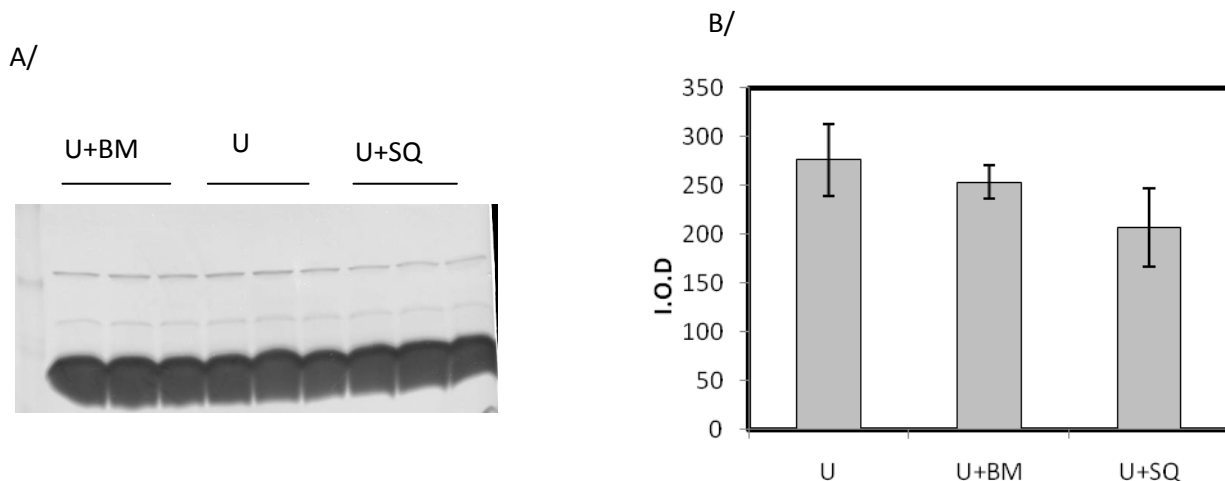


Figure III.17 : Effet du U46619 (U) sur l'activité enzymatique des MMPs. Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec l'agoniste du récepteur TP : le U46619 à 1 μ M avec ou sans antagonistes du récepteur TP le BM-520 (BM) ou le SQ29548 (SQ) à 1 μ M. Après 24 heures d'incubation, les surnageants sont collectés, concentrés et mis dans le gel contenant de la gélatine. Trois échantillons provenant de trois expériences indépendantes ont été déposés dans le gel. Ces cellules proviennent d'une souche différente de celle utilisée à la figure III.16. A : zymogramme, B : quantification de la bande à 98 kDa via l'utilisation du programme ImageQuant de General Electric.

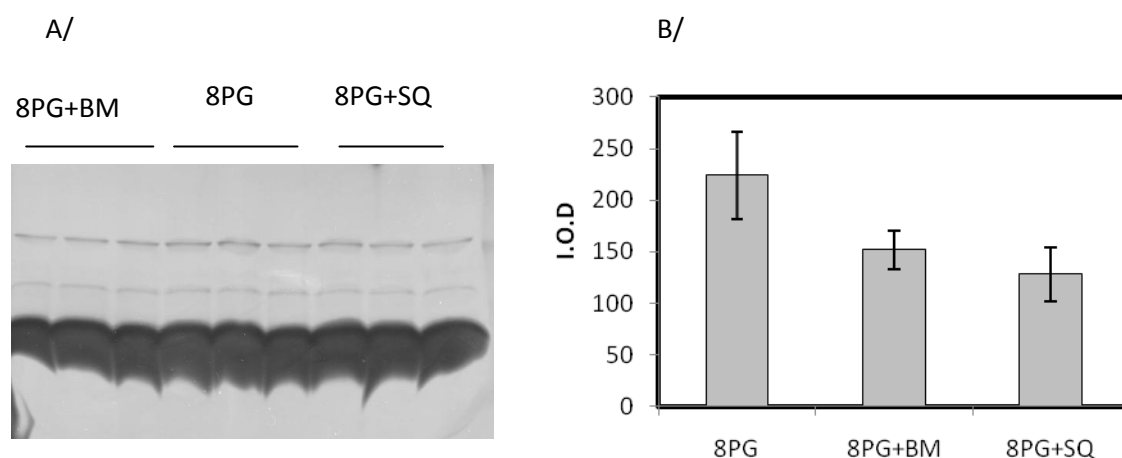


Figure III.18 : Effet du 8-iso-PGF_{2 α} (8PG) sur l'activité enzymatique des MMPs. Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec l'agonistes du récepteur TP : le 8-iso-PGF_{2 α} à 50 μ M avec ou sans antagonistes du récepteur TP le BM-520 (BM) ou le SQ29548 (SQ) à 1 μ M. Après 24 heures d'incubation, les surnageants sont collectés, concentrés et mis dans le gel contenant de la gélatine. Trois échantillons provenant de trois expériences indépendantes ont été déposés dans le gel. Ces cellules proviennent d'une souche différente de celle utilisée à la figure III.16. A : zymogramme, B : quantification de la bande à 98 kDa via l'utilisation du programme ImageQuant de General Electric.

zymogramme qui modifie la migration des protéines dans le gel.

En outre, la morphologie de certaines bandes comme celle observée à 58 kDa est modifiée par la présence de la BSA dans le milieu de culture. En effet pour les incubations en présence des agonistes avec ou sans pré-incubation avec les antagonistes, 0,5 % de BSA sont ajoutés dans le milieu de culture sans sérum. La BSA se lie à de nombreuses protéines et modifie la migration de ces protéines dans le gel. C'est la raison pour laquelle, une filtration a été effectuée pour éliminer la BSA. Comme le montre la **Figure III.11**, la morphologie des bandes observées après migration avant et après filtration de la BSA est différente. Cette observation est aussi confirmée par un western-blot réalisé en utilisant un ECL « advanced ». Une bande à 62 kDa (correspondant au poids moléculaire d'une MMP2) et une légère bande à 98 kDa sont aussi reconnues par l'anticorps anti-MMP2 (**Figure III.12**).

Toutes ces observations suggèrent que la bande ayant un poids moléculaire apparent de 58 kDa sur le zymogramme correspondrait à une forme active de la MMP2 et que la bande ayant un poids moléculaire apparent de 98 kDa correspondrait à une forme active de la MMP2 en complexe avec une autre protéine.

1.1.1 Effets des agonistes du récepteur TP sur l'activité enzymatique des MMPs

Etant donné que les agonistes du récepteur TP induisent une augmentation du taux d'expression de l'ARNm codant pour MMP2 et qu'au vu des résultats précédents, la majorité des MMPs actives sont des MMP2 seules ou en complexes, l'activité des MMPs a été mesurée par zymogramme afin de confirmer si les effets obtenus par Real-Time PCR pouvaient aussi se produire au niveau protéique.

Nous avons vu que quatre bandes claires (98 kDa, 78 kDa, 73 kDa et 58 kDa) sont observées sur le zymogramme. La bande qui nous intéresse tout particulièrement est celle se trouvant à un poids moléculaire de 98 kDa car en fonction des incubations, l'intensité de cette bande semble varier. D'après la **Figure III.5**, le SIN-1 ne semble pas affecter l'activité enzymatique de cette MMP vu que l'intensité de la bande correspondante est similaire à l'intensité de la bande des cellules contrôles. Le U46619, le 8-iso-PGF_{2α}, l'IL-1β et l'IL-18 augmentent l'activité enzymatique de cette MMP.

Différentes dilutions des échantillons provenant de cellules incubées en présence du U46619 et de cellules contrôles ont été examinées dans le but de vérifier si cette technique était quantitative. Comme le montre la **Figure III.13**, l'effet du U46619 sur l'activité enzymatique de ces MMPs comparé aux cellules contrôles est visible sur toutes les dilutions. Cette technique est une technique semi-quantitative permettant d'observer des différences d'activité enzymatique.

Pour confirmer les résultats obtenus précédemment, trois expériences indépendantes ont été réalisées. Les **Figures III.14 et III.15** montrent l'effet du U46619 et du 8-iso-PGF_{2α} sur

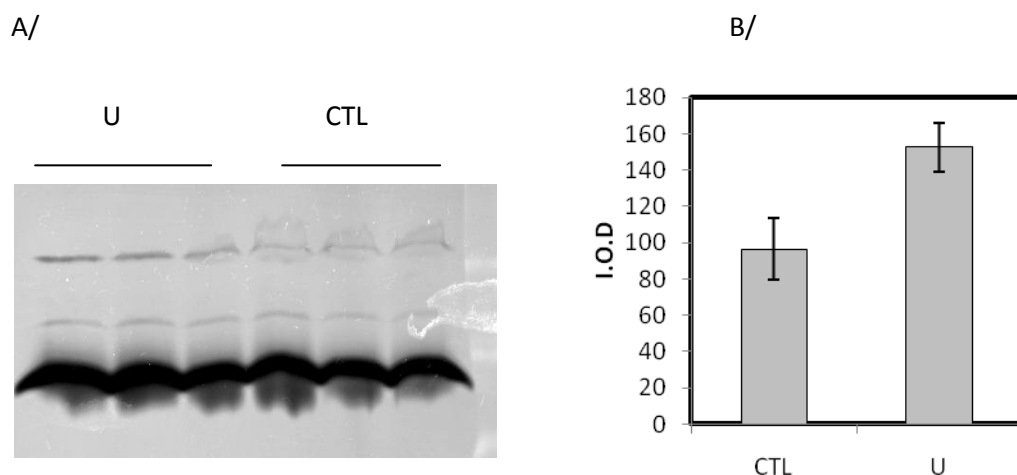


Figure III.19 : Effet du U46619 (U) sur l'activité enzymatique des MMPs normalisé par rapport à la quantité de cellules. Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec l'agoniste du récepteur TP : le U46619 à 1 μ M. Après 24 heures d'incubation, les surnageants sont collectés, concentrés et mis dans le gel contenant de la gélatine. Trois échantillons provenant de trois expériences indépendantes ont été déposés dans le gel. A : zymogramme, B : quantification de la bande à 98 kDa via l'utilisation du programme ImageQuant de General Electric.

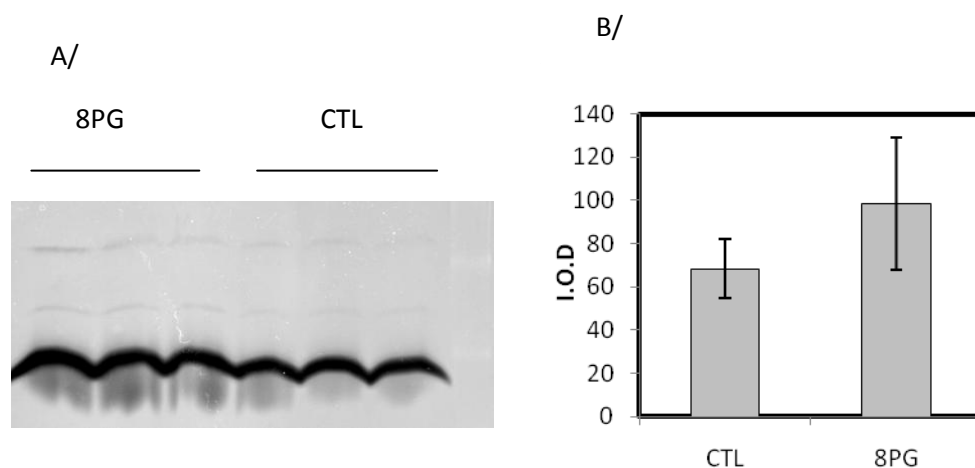


Figure III.20 : Effet du 8-iso-PGF_{2 α} (8PG) sur l'activité enzymatique des MMPs normalisé par rapport à la quantité de cellules. Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec l'agoniste du récepteur TP : le 8-iso-PGF_{2 α} à 50 μ M. Après 24 heures d'incubation, les surnageants sont collectés, concentrés et mis dans le gel contenant de la gélatine. Trois échantillons provenant de trois expériences indépendantes ont été déposés dans le gel. A : zymogramme, B : quantification de la bande à 98 kDa via l'utilisation du programme ImageQuant de General Electric.

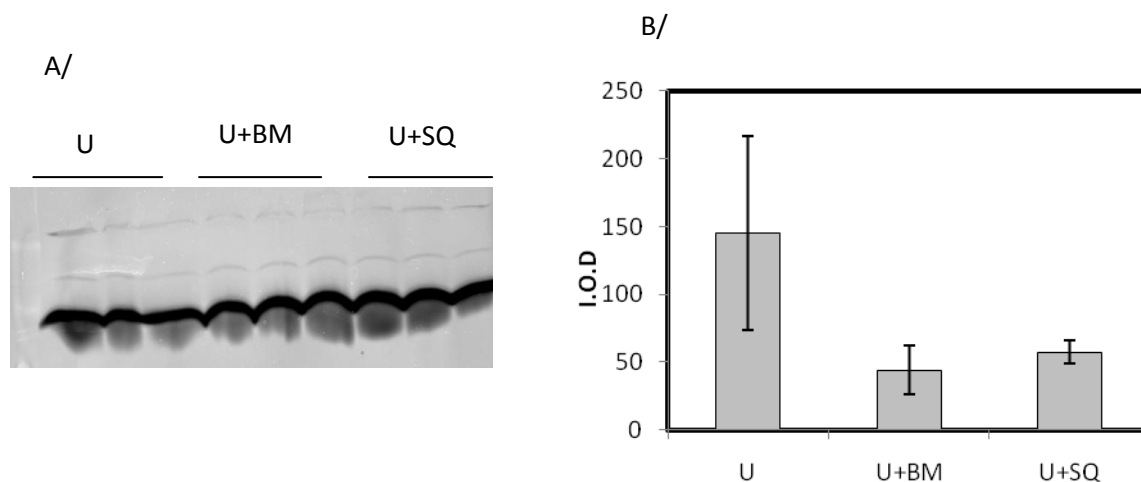


Figure III.21 : Effet du U46619 (U) sur l'activité enzymatique des MMPs normalisé par rapport la quantité de cellules. Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec l'agoniste du récepteur TP : le U46619 à 1 μ M avec ou sans antagonistes du récepteur TP le BM-520 (BM) ou le SQ29548 (SQ) à 1 μ M. Après 24 heures d'incubation, les surnageants sont collectés, concentrés et mis dans le gel contenant de la gélatine. Trois échantillons provenant de trois expériences indépendantes ont été déposés dans le gel. A : zymogramme, B : quantification de la bande à 98 kDa via l'utilisation du programme ImageQuant de General Electric.

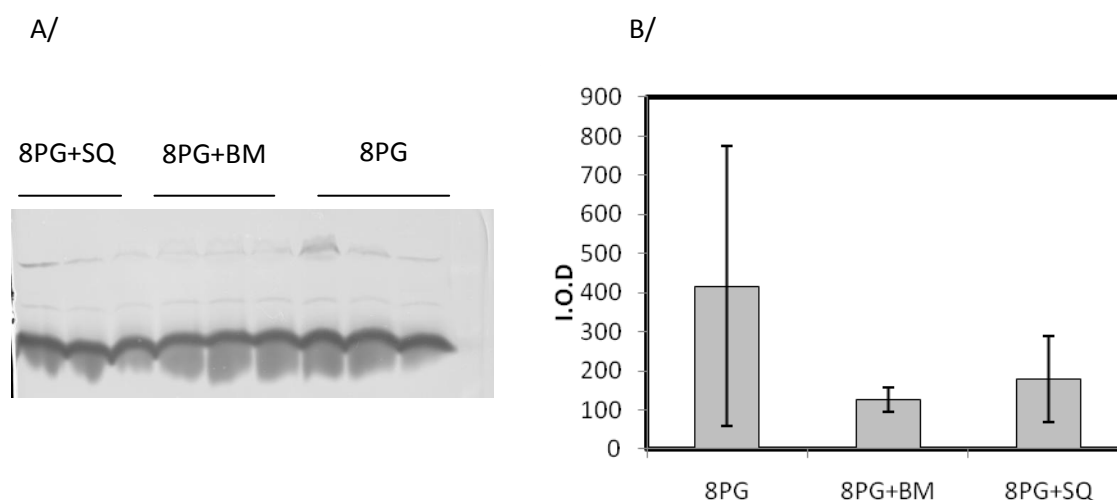


Figure III.22 : Effet du 8-iso-PGF_{2 α} (8PG) sur l'activité enzymatique des MMPs normalisé par rapport à la quantité de cellules. Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec l'agoniste du récepteur TP : le 8-iso-PGF_{2 α} à 50 μ M avec ou sans antagonistes du récepteur TP le BM-520 (BM) ou le SQ29548 (SQ) à 1 μ M. Après 24 heures d'incubation, les surnageants sont collectés, concentrés et mis dans le gel contenant de la gélatine. Trois échantillons provenant de trois expériences indépendantes ont été déposés dans le gel. A : zymogramme, B : quantification de la bande à 98 kDa via l'utilisation du programme ImageQuant de General Electric.

l'activité enzymatique de la MMP observée comparé aux cellules contrôles. L'intensité de la bande correspondant au milieu des cellules incubées en présence du U46619 ou du 8-iso-PGF_{2α}, est plus importante que l'intensité des trois autres bandes correspondant au milieu des cellules contrôles. Une augmentation de respectivement 41 et 30 fois sont observées.

Etant donné que les agonistes du récepteur TP augmentent l'activité enzymatique des MMPs présentes dans le milieu, il est intéressant d'étudier si des antagonistes du récepteur TP ne moduleraient pas l'action du U46619 ou du 8-iso-PGF_{2α} sur cette activité enzymatique. Un pré-traitement avec les antagonistes BM-520 et SQ29548 empêche partiellement l'augmentation de l'activité enzymatique de ces MMPs (**Figure III.16**). Pour confirmer ce résultat, trois expériences indépendantes ont été effectuées. Un pré-traitement avec l'antagoniste SQ29548 semble induire une diminution plus importante de l'activité enzymatique des MMPs comparé à l'antagoniste BM-520 (**Figures III.17 et III.18**).

En outre, lorsque l'on effectue un zymogramme, la quantité protéique mis dans chaque puits du gel en fonction des conditions n'est peut-être pas équivalente. C'est pourquoi, nous avons essayé d'estimer la quantité cellulaire en quantifiant la concentration protéique à l'aide d'un Folin. Un zymogramme a également été réalisé où la quantité cellulaire mis dans chaque puits du gel est identique.

Les effets du U46619 et du 8-iso-PGF_{2α} sur l'activité enzymatique de ces MMPs normalisée par rapport à la quantité cellulaire sont toujours observables (**Figures III.19 et III.20**). Un pré-traitement avec les antagonistes du récepteur TP, le BM-520 et le SQ29548, diminue toujours l'activité enzymatique de ces MMPs comparé à l'effet des agonistes du récepteur TP (**Figures III.21 et III.22**).

En conclusion, le U46619 et le 8-iso-PGF_{2α} augmentent l'activité enzymatique de la MMP présente dans la bande à 98 kDa. Cette augmentation d'activité est probablement due à une augmentation de la sécrétion de l'enzyme puisque les agonistes du récepteur TP augmentent aussi l'expression de l'ARNm encodant la MMP2. Un pré-traitement avec des antagonistes du récepteur TP, le BM-520 et le SQ29548, atténue l'effet du U46619 ou du 8-iso-PGF_{2α}, suggérant que l'analogue du TXA₂ et le 8-iso-PGF_{2α} agiraient via le récepteur TP.

2. Effets des agonistes et des antagonistes du récepteur TP sur la prolifération cellulaire

L'effet des agonistes du récepteur TP sur l'induction de la prolifération des AoSMCs a ensuite été examiné. Il a été montré précédemment que les agonistes du récepteur TP induisent la prolifération cellulaire dans les hSMCs. Il serait donc intéressant de voir si les agonistes pouvaient également induire la prolifération cellulaire dans les AoSMCs.

Les cellules ont été stimulées en présence du U46619 à 1 μM ou du 8-iso-PGF_{2α} à 50 μM. Les cellules sont pré-incubées avec ou sans antagonistes du récepteur TP, le BM-520 à 1 μM ou

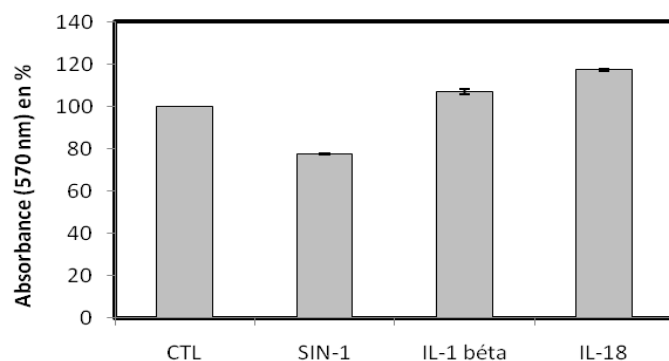
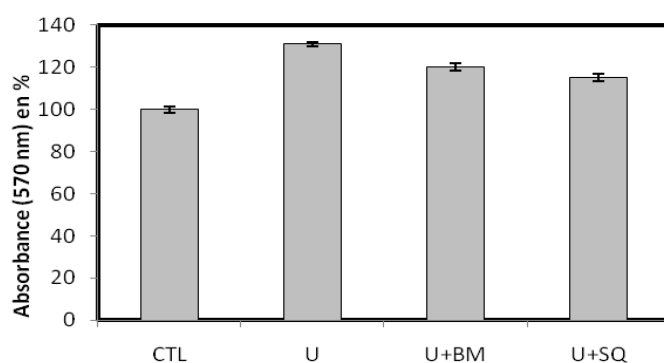


Figure III.23 : Effet de SIN-1, de l'IL-1 β et de l'IL-18 sur la prolifération cellulaire. Les cellules sont incubées 24 heures avec du SIN-1 à 0,5 mM, de l'IL-1 β à 3 ng/ml ou de l'IL-18 à 10 ng/ml. Après incubation, la quantité de cellules vivantes a été estimée à l'aide d'un test MTT. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne, n=3.

A/



B/

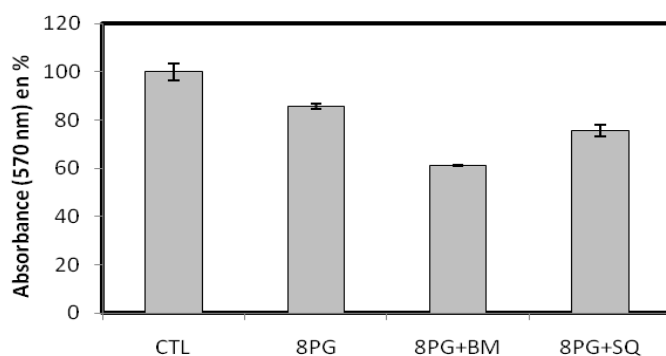


Figure III.24 : Effet des agonistes du récepteur TP sur la prolifération cellulaire. Les cellules sont incubées 24 heures avec un agoniste du récepteur TP le U46619 (U) (A) à 1 μ M ou le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ (8PG) (B) à 50 μ M avec ou sans antagonistes du récepteur TP le BM-520 (BM) ou le SQ29548 (SQ) à 1 μ M. Après incubation, la quantité de cellules vivantes a été estimée à l'aide d'un test MTT. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne, n=3.

SQ29548 à 1 μ M. Après 24 heures de stimulation, le nombre de cellules vivantes est déterminé par un test MTT.

Une légère prolifération est observable lorsque les cellules sont incubées en présence d'IL-1 β ou d'IL-18. Les résultats ne montrent aucune augmentation de la prolifération en présence de SIN-1 (**Figure III.23**). Lorsque les cellules sont en présence du U46619, une petite prolifération est percevable (**Figure III.24 A**). Cependant, un ralentissement de la prolifération est visible lorsque les cellules sont incubées en présence du 8-iso-PGF_{2 α} , et même lorsque celui-ci est associé à un des antagonistes du récepteur TP (**Figure III.24 B**). Les antagonistes du récepteur TP pré-incubés une heure avant le U46619 semblent induire une légère prolifération cellulaire.

3. Effets des agonistes du récepteur TP sur la migration des AoSMCs

La migration des cellules musculaires lisses joue un rôle important dans le remodelage vasculaire durant la maladie mais aussi dans la stabilité de la plaque athéromateuse. La migration des cellules musculaires lisses nécessite la dégradation de la matrice extracellulaire par les MMPs. Les MMP2 et MMP9 sont les principales MMPs intervenant dans la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima (Li, Liang et al. 2007).

3.1 Effet des agonistes et des antagonistes du récepteur TP sur la migration des AoSMCs

Les résultats des expériences précédentes montrent que la stimulation des AoSMCs par les deux agonistes différents conduit à une augmentation d'ARNm encodant la MMP2 et que les MMP2 secrétées dans le milieu sont actives. Nous avons tout d'abord voulu savoir si les agonistes du récepteur TP pouvaient intervenir dans la migration. Ensuite, nous avons déterminé si les MMPs pouvaient participer à la migration des AoSMCs.

Nous avons utilisé le U46619 et le 8-iso-PGF_{2 α} comme agoniste du récepteur TP et le BM-520 et le SQ29548 comme antagonistes du récepteur TP. L'IL-1 β , l'IL-18 n'agissant pas directement sur le récepteur TP sont utilisées comme des contrôles positifs.

Après 24 heures de stimulation, les cellules non stimulées ne migrent pas pour recoloniser la zone dénudée par le « scatch » tandis que les cellules stimulées avec de l'IL-1 β ou de l'IL-18 commencent à migrer. Cet effet est beaucoup plus marqué après 48 heures de stimulation (**Figure III.25**). Le U46619 et le 8-iso-PGF_{2 α} stimulent aussi la migration des AoSMCs. Cette migration est observable à partir de 24 heures et plus visible à partir de 48 heures d'incubation en présence des deux agonistes du récepteur TP. Il semblerait que les cellules incubées en présence du U46619 migrent en plus grand nombre en comparaison à celles incubées en présence de 8-iso-PGF_{2 α} . Les antagonistes toujours pré-incubés une heure avant d'ajouter les agonistes, entraînent une nette diminution de la migration des AoSMCs. La migration des cellules incubées en présence des antagonistes ajoutés une heure avant l'agoniste est comparable à celui observée pour les cellules contrôle (**Figure III.26 et III.27**).

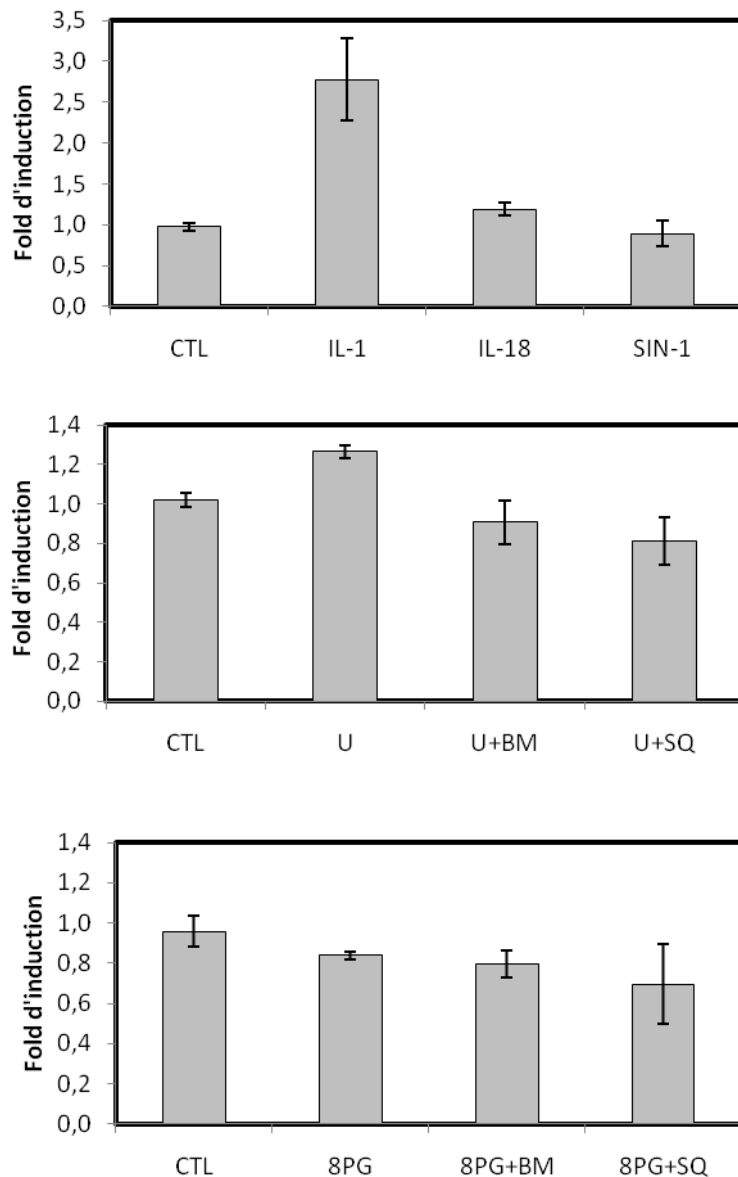


Figure III.29 : Effets des agonistes du récepteur TP sur l'abondance de l'ARNm d'ICAM-1. Les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence des agonistes U46619 (U) ou 8-iso-PGF_{2α} (8PG) avec ou sans pré-incubation d'une heure des antagonistes SQ29548 (SQ) et BM-520 (BM). Différents contrôles positifs sont utilisés : IL-1 β (IL-1), IL-18 et SIN-1. Après l'incubation, l'ARN total est extrait et retranscrit. L'ARNm du gène ICAM-1 a, par après, été amplifié et quantifié par PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés en fold d'induction, en tant que moyenne \pm n écart-type (n=3).

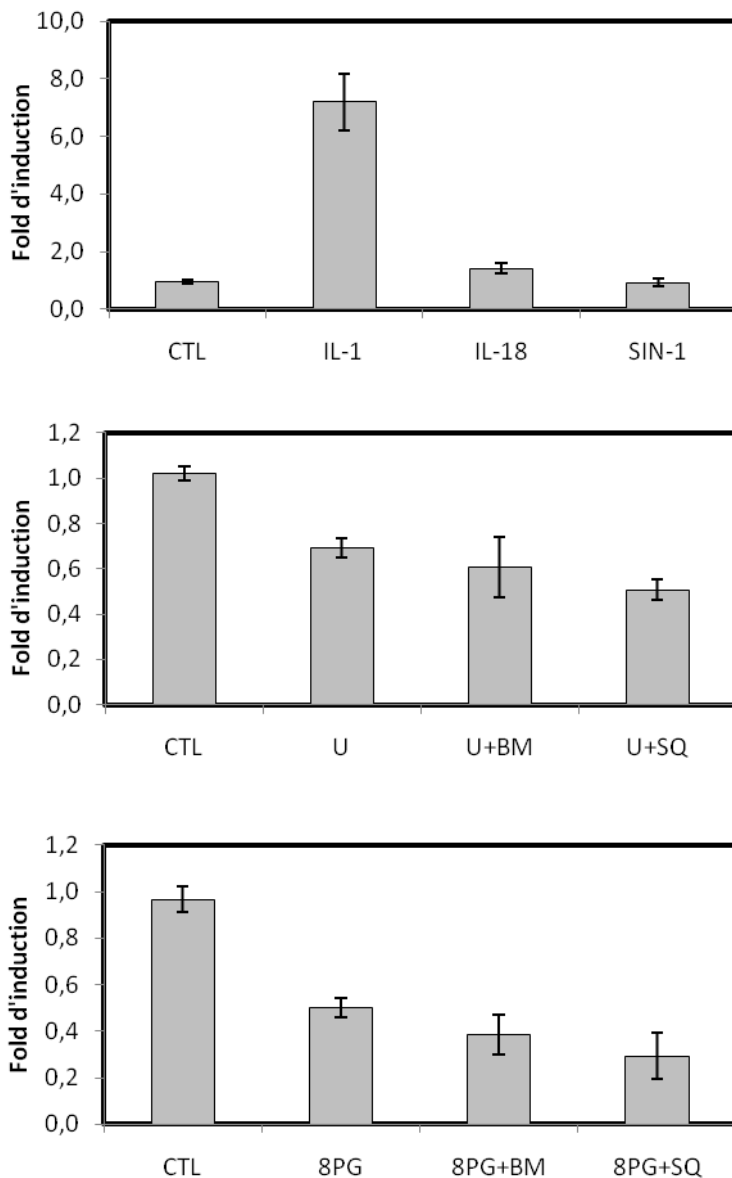


Figure III.30 : Effets des agonistes du récepteur TP sur l'abondance de l'ARNm de VCAM-1. Les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence des agonistes U46619 (U) ou 8-iso-PGF_{2α} (8PG) avec ou sans pré-incubation d'une heure des antagonistes SQ29548 (SQ) et BM-520 (BM). Différents contrôles positifs sont utilisés : IL-1 β (IL-1), IL-18 et SIN-1. Après l'incubation, l'ARN total est extrait et retranscrit. L'ARNm du gène VCAM-1 a, par la suite, été amplifié et quantifié par PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés en fold d'induction, en tant que moyenne \pm n écart-type (n=3).

En conclusion, les agonistes du récepteur TP semble induire la migration cellulaire tandis qu'une pré-incubation avec les antagoniste diminue cette migration.

3.1 Effets des inhibiteurs des MMPs sur la migration des AoSMCs

Afin d'étudier le rôle des MMPs sur la migration des AoSMCs, un inhibiteur MMP2 à une concentration de 0,1 mM et un inhibiteur à MMP9 à une concentration de 2 μ M ont été utilisés. Des concentrations plus élevées ont été testées. Cependant elles étaient toxiques pour les cellules.

Après 24 heures de stimulation, le U46619 stimule la migration des AoSMCs. L'inhibiteur MMP2 incubé avec le U46619 entraîne une nette diminution de la migration des AoSMCs. L'inhibiteur MMP9 incubé avec le U46619 stimule la migration des AoSMCs. Tous ces effets sont beaucoup plus visibles après 48 heures d'incubation des différentes molécules. Ces résultats suggèrent que la migration des AoSMCs se fait via la libération de MMP2 et non pas de MMP9 (**Figure III.28**).

4. Effets des agonistes du récepteur TP sur l'induction d'un phénotype inflammatoire dans les AoSMCs

4.1 Effets des agonistes du récepteur TP sur l'abondance de l'ARNm de gènes impliqués dans l'inflammation

L'activation du récepteur TP peut déclencher différentes voies de signalisation pouvant amener à l'expression de molécules d'adhérences. VCAM-1 et ICAM-1 sont deux molécules d'adhérence impliquées dans le recrutement de leucocytes au niveau du site inflammatoire, ainsi que dans les plaques d'athérosclérose.

Nous avons étudié le niveau d'expression d'ARNm de ces deux gènes impliqués dans l'inflammation. Cette analyse a été réalisée par RT-PCR en temps réel dans trois expériences indépendantes.

Lors de cette étude, le U46619 à 1 μ M et le 8-iso-PGF_{2 α} à 50 μ M ont été utilisés comme agonistes du récepteur TP et le BM-520 à 1 μ M et le SQ29548 à 1 μ M ont été utilisés comme antagonistes du récepteur TP. L'effet de contrôles positifs tels que l'IL-1 β à 3 ng/ml, l'IL-18 à 10 ng/ml et le SIN-1 à 0,5 mM ont aussi été investigué.

L'IL-1 β induit une augmentation du niveau d'ARNm de ces deux gènes. Une stimulation l'IL-18 induit une faible augmentation du niveau d'ARNm de ces deux gènes. Par contre, le SIN-1 ne semble pas influencer l'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1 (**Figures III.29 et III.30**). Le U46619 induit une augmentation de l'ARNm codant pour ICAM-1 de 1,3 fois et une diminution de l'ARNm codant pour VCAM-1. Par contre, le 8-iso-PGF_{2 α} n'influence pas le niveau d'expression de l'ARNm de ICAM-1 et diminue celui de VCAM-1. La pré-incubation avec les antagonistes diminuent le niveau d'ARNm du gène ICAM-1 en comparaison avec le niveau induit par les agonistes du récepteur TP.

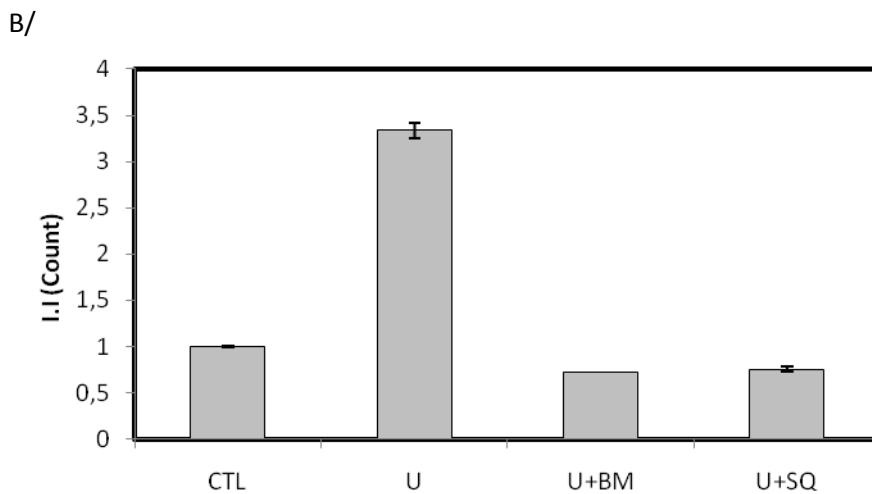
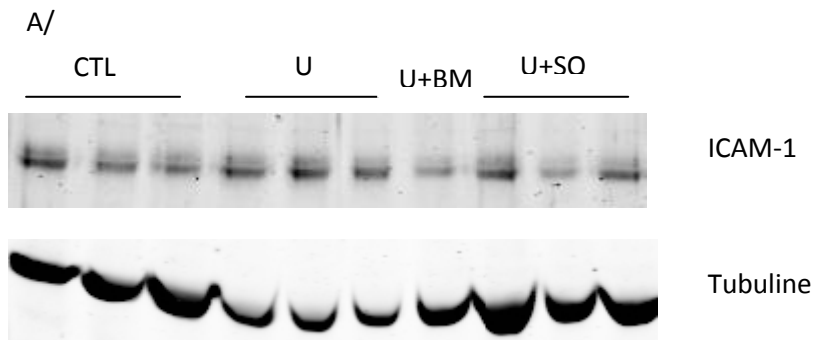


Figure III.31 : Expression d'ICAM-1 dans les AoSMCs. Les cellules AoSMCs ont été incubées pendant 36 heures dans du milieu de culture et en présence ou non de l'agoniste U46619 à 1 μ M et/ou des antagonistes du récepteur TP : BM-520 à 1 μ M ou SQ29548 à 1 μ M. Des extraits protéiques ont été réalisés. Après électrophorèse et transfert des protéines sur membrane, la protéine ICAM-1 a été révélée à l'aide d'un anticorps spécifique. Le contrôle de charge correspond à la tubuline. A : Western-blot, B : Quantification de l'abondance d'ICAM-1.

Ces résultats indiquent que le U46619 augmente le niveau d'expression d'ARNm codant pour ICAM-1. Une pré-incubation avec les antagonistes diminue ce niveau d'expression. De plus, 8-iso-PGF_{2α} ne semble pas influencer le niveau d'expression d'ARNm codant pour ICAM-1.

4.2 Effet des agonistes du récepteur TP sur l'abondance protéique d'ICAM-1

Comme les résultats précédents montrent une augmentation d'ARNm encodant ICAM-1 lorsque les cellules sont en présence du U46619, on a voulu vérifier l'abondance protéique d'ICAM-1. Pour ce faire, des extraits protéiques ont été réalisés à partir des AoSMCs stimulées 36 heures avec l'agoniste et pré-incubées ou non avec les antagonistes du récepteur TP. Après électrophorèse et transfert des protéines sur une membrane, la protéine ICAM-1 a été révélée à l'aide d'un anticorps spécifique par un western-blot.

Les cellules ont été stimulées pendant 36 heures car une stimulation de 24 heures avec les différentes molécules ne semblaient pas être suffisante pour induire l'expression d'ICAM-1 en surface. Il y a toujours un petit décalage entre la transcription du gène ICAM-1 et la traduction de cette ARNm encodant ICAM-1 en protéine puis l'expression de celle-ci à la surface des SMCs.

Les cellules ont été stimulées 36 heures avec l'agoniste U46619, stimulation précédée ou non par une incubation d'une heure en présence des antagonistes du récepteur TP. Après 36 heures de stimulation, le U46619 semble induire une augmentation de l'abondance de la protéine ICAM-1 de 3,3 fois. La pré-incubation avec les antagonistes du récepteur TP empêche l'effet de l'agoniste. L'abondance protéique d'ICAM-1 semble retomber en dessous de celui induit par les cellules contrôles (**Figure III.31**).

Ce résultat est un résultat préliminaire qui devra être confirmée par la suite.

IV. Discussion, conclusions et perspectives

V. Discussion, Conclusions et Perspectives

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des artères de moyen et gros calibres. Elle est considérée comme la principale cause de décès dans les pays industrialisés (Lusis 2000). Cette maladie est influencée par de nombreux facteurs biochimiques tels que les cytokines, les chemokines, les facteurs de croissance et les dérivés de l'acide arachidonique. Les dérivés de l'acide arachidonique dérivent à la fois d'une voie enzymatique aboutissant à la formation de thromboxane A_2 (TXA₂) et de prostaglandines et d'une voie non-enzymatique aboutissant à la formation d'isoprostanes. La production de TXA₂ et d'isoprostane est anormalement élevée dans le sang de patients atteints de l'athérosclérose ainsi que dans les plaques athéromateuses. Ces molécules, en agissant via le récepteur TP, jouent un rôle important dans l'athérogénèse en modulant la réponse inflammatoire, l'expression des métalloprotéinases, la prolifération cellulaire et l'adhérence plaquettaire (Dogne, Hanson et al. 2005). Une étude a démontré que des souris Apo E^{-/-} TP^{-/-} avaient des plaques athéromateuses de taille significativement plus petite en comparaison des souris Apo E^{-/-}, suggérant l'implication du récepteur TP dans l'athérosclérose (Kobayashi, Tahara et al. 2004). Différentes drogues inhibant la biosynthèse du TXA₂ et l'isoprostane et/ou leur action ont été développées dans le but de diminuer le développement des plaques athéromateuses (Nakahata 2008). L'inhibition de la synthèse du TXA₂ et de l'isoprostane via une inhibition des cyclooxygénases -1 ou -2 semble difficile à atteindre en un seul traitement. Dès lors, des antagonistes du récepteur TP ont été développés pour bloquer les effets de ces deux médiateurs lipidiques (Dogne, Hanson et al. 2005). Tillmann Cyrus et ses collaborateurs ont ainsi démontré que BM-573, un antagoniste du récepteur TP, réduisait la progression de l'athérosclérose et affectait la composition cellulaire de la plaque : le nombre de macrophages était plus faible tandis que celui des cellules musculaires lisses et du collagène était élevé au sein de la plaque athéromateuse, signe d'une plaque stable (Tang, Cyrus et al. 2005). Ensuite, ils ont aussi mis en évidence que la combinaison de deux drogues SC-560, un inhibiteur sélectif de COX-1, et BM-573, diminue significativement l'athérosclérose avec une réduction significative de l'inflammation vasculaire, du nombre de macrophages au sein de la plaque athéromateuse, et une augmentation du collagène et du nombre de cellules musculaires lisses au niveau de ces plaques. Toutes ces observations suggèrent l'importance d'utiliser des antagonistes du récepteur TP seuls ou en combinaison avec un autre inhibiteur sélectif pour diminuer l'athérogenèse (Cyrus, Yao et al. 2007). Le récepteur TP est exprimé par de nombreux types cellulaires tels que les astrocytes, les cellules mésangiales, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Les effets des agonistes du récepteur TP ont été majoritairement étudiés sur les cellules endothéliales. Par contre, on ne dispose, à l'heure actuelle, que de peu de données des effets des agonistes du récepteur TP sur les cellules musculaires lisses des artères touchées. De plus, la majorité des travaux effectués sur des cellules musculaires lisses est réalisée sur des cellules animales, notamment sur rat. Il existe de nombreuses différences entre les cellules humaines et les cellules animales. Une des principales est qu'on ne retrouve pas les deux isoformes α et β du récepteur TP chez le rat et la souris : le récepteur TP du rat et de la souris a de grandes similitudes avec l'isoforme α de l'humain (Nakahata 2008).

Des résultats précédents obtenus au laboratoire ont montré une expression des deux isoformes α et β du récepteur TP dans les cellules musculaires lisses d'aorte humaine, et ceci par PCR en temps réel (mémoire de Christophe Copine, 2009). L'expression protéique du récepteur a ensuite été mise en évidence à l'aide d'un western-blot et a été comparée à celle de cellules endothéliales suggérant que

l'abondance de ce récepteur était plus élevée dans les cellules musculaires lisses que dans les cellules endothéliales EAhy926.

L'objectif principal de ce mémoire était donc de caractériser les effets de deux agonistes du récepteur TP (le U46619 et le 8-iso-PGF_{2α}) dans différents paramètres impliqués de l'athérosclérose sur les cellules musculaires lisses humaines. Nous avons ainsi suivi les effets de ces deux agonistes sur la production de métalloprotéinases (MMPs) par les cellules musculaires lisses aortiques humaines (AoSMCs), sur leur migration, leur prolifération et l'induction d'un phénotype inflammatoire. La modulation de l'activation du récepteur TP est une cible thérapeutique pour retarder ou empêcher le développement de l'athérosclérose. C'est pourquoi, deux antagonistes du récepteur TP (le BM-520 et le SQ29548) ont également été utilisés.

Le U46619 est une molécule synthétique dont la structure a été optimisée spécifiquement pour se lier au récepteur TP tandis que le 8-iso-PGF_{2α} est un isoprostane naturel endogène agissant sur le récepteur TP. Le SQ29548 est un antagoniste standard du récepteur TP tandis que le BM-520 est un antagoniste original du récepteur TP développé au Département de Pharmacie.

La prolifération et la migration des cellules musculaires lisses (SMCs) jouent un rôle important dans le remodelage vasculaire durant la maladie mais aussi dans la stabilité de la plaque athéromateuse. La migration des SMCs et l'hyperplasie néointimale impliquent la dégradation de la matrice extracellulaire par les MMPs (Chandrasekar, Mummidhi et al. 2006). Au sein des plaques athéromateuses, les cellules endothéliales et les SMCs produisent activement des MMPs. Cependant, les macrophages semblent être le plus grand producteur de MMPs (Oviedo-Orta, Bermudez-Fajardo et al. 2008). Les SMCs expriment la MMP2 et la MMP9, deux gélatinases impliquées dans le processus de destruction de la matrice extracellulaire (Chandrasekar, Mummidhi et al. 2006). Ohshima et ses collaborateurs ont démontré que les souris Apo E^{-/-} déficientes en MMP9 ou en MMP2 ont une réduction des lésions athéromateuses en comparaison des souris Apo E^{-/-}, suggérant l'implication des MMPs dans le développement de plaque athéromateuse (Ohshima, Petrov et al. 2009).

Une étude a également démontré que le 8-iso-PGF_{2α} augmentait l'activité des MMPs dont la MMP9 mais aussi celui d'un inhibiteur des MMPs : le TIMP-1, dans les macrophages THP-1 (Scholz, Aukrust et al. 2004). De plus, un traitement avec un antagoniste du récepteur TP, le S18886, induit une régression des plaques athéromateuses avancées chez le lapin. Une réduction dans l'abondance des marqueurs pour les macrophages, les cellules apoptotiques et les MMPs ainsi qu'une augmentation des SMCs vasculaires sont aussi observables. Ces résultats suggèrent que cet agoniste du récepteur TP est fortement impliqué dans la progression de l'athérosclérose et la stabilité de la plaque athéromateuse (Viles-Gonzalez, Fuster et al. 2005).

Ces données de la littérature nous ont incités à étudier dans ce mémoire les effets des agonistes du récepteur TP (le U46619 et le 8-iso-PGF_{2α}) et des antagonistes du récepteur TP (le BM-520 et le SQ29548) sur l'expression des MMPs. Cette étude a été réalisée à la fois aux niveaux transcriptionnel et protéique. Il est à noter que les cellules ont été incubées en présence des agonistes du récepteur TP et des antagonistes du récepteur TP pendant 24 heures car Chandrasekar et al. ont démontré que c'était le temps optimal pour stimuler les SMCs humaines (Chandrasekar, Mummidhi et al. 2006).

Le U46619 augmente le niveau d'expression d'ARNm encodant la MMP2, la MMP3 et la MMP1 tandis que le 8-iso-PGF_{2α} n'augmente que le niveau d'expression d'ARNm encodant la MMP2. Un

pré-traitement avec les antagonistes du récepteur TP diminue le niveau d'expression des ARNm encodant la MMP2, la MMP3 et la MMP1. Les MMPs peuvent être régulées à différents niveaux : le premier niveau est la transcription, le second niveau est l'activation du pro-enzyme et le dernier niveau est une inhibition spécifique par des inhibiteurs de MMPs aussi appelé TIMPs.

Etant donné que les deux agonistes du récepteur TP augmentent l'expression de l'ARNm de MMP2, les activités enzymatiques de différentes MMPs ont été mises en évidence à l'aide d'un zymogramme. Lors de ces expériences, l'IL-1 β , l'IL-18 et le SIN-1 ont été utilisés comme contrôles positifs. Quand les SMCs sont incubées en présence de la cytokine pro-inflammatoire, l'IL-1 β , des MMPs telles que la MMP2 et d'autres protéases sont libérées (Kaden, Dempfle et al. 2003). Le second contrôle positif est une cytokine pro-inflammatoire et pro-athérogénique : l'IL-18. Cette cytokine stimule l'expression de MMP2 et MMP9, à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Chandrasekar, Mummidu et al. 2006). Le dernier contrôle positif est le SIN-1. Le SIN-1 est une molécule produisant du peroxynitrite, elle a été utilisée pour mimer un stress oxydatif, du type de celui généré par l'inflammation retrouvée dans les plaques athéromateuses. Donald J. Brown a démontré que le SIN-1 augmente le niveau d'ARNm de TIMP-1 et de MMP2 dans les fibroblastes du stroma (Brown, Lin et al. 2004).

Quatre bandes claires ont été détectées sur le zymogramme (une à 98 kDa, une à 78 kDa, une à 73 kDa et une à 58 kDa) indiquant l'activité enzymatique de différentes MMPs dans le surnageant des cellules musculaires lisses humaines. Ces quatre bandes correspondent à l'activité enzymatique de MMP2, qui peut être seule ou en complexe. La MMP2 est constitutivement exprimée dans les SMCs vasculaires (Newby 2005). La bande claire à 58 kDa pourrait correspondre à de la MMP2 qui est principalement exprimée par les AoSMCs. Bien que le poids moléculaire apparent de la MMP2 devrait être de 62 kDa et qu'il n'est que de 58 kDa sur le zymogramme, nous suggérons que cette bande correspondrait à une MMP2. Notre hypothèse se base sur le fait que l'activité enzymatique de cette MMP a été inhibée par un inhibiteur spécifique de la MMP2 et que cette MMP a été mise en évidence par un anticorps spécifique de la MMP2 par western-blot. La différence au niveau du poids moléculaire pourrait être due à la présence de BSA dans le milieu de culture. La BSA, protéine se liant à de nombreuses protéines, modifie la migration des protéines dans le gel y compris de la MMP2. La dernière bande à 98 kDa pourrait correspondre à une MMP2 en complexe. La MT1-MMPs, une membrane-type MMP, est un activateur soluble de la pro-MMP2. L'activité des MMPs est aussi régulée par des inhibiteurs de MMPs tels que la TIMP-2 (22 kDa). Dans certains cas, l'activation de pro-MMP2 requière à la fois MT1-MMPs et TIMP-2. TIMP-2 permet de faire un lien moléculaire entre MT1-MMP présent à la surface cellulaire et la pro-MMP2. La région N-terminale de TIMP-2 se lie au site actif de MT1-MMP et la région C-terminale de l'inhibiteur se lie au domaine hemopexin-like du pro-MMP2 formant ainsi le « complexe ternaire ». La forte affinité de liaison et la conformation du complexe pro-MMP2 et TIMP-2 permet à la région N-terminale de TIMP-2 de se détacher du site actif MT1-MMP du complexe trimérique en solution ou en surface cellulaire (Zhao, Bernardo et al. 2004). Une forte interaction entre TIMP-2 et le domaine hemopexin-like de la MMP2 a aussi été mise en évidence par des expériences de double hybride en levure (Overall, Tam et al. 2000). Une étude, utilisant des fibroblastes cervicaux utérins traités avec de la concanavaline et exprimant des MT1-MMP, a également démontré que la MMP2 active pouvait se retrouver dans un complexe avec TIMP-2 dans le milieu de culture (Bernardo and Fridman 2003). Toutes ces observations suggèrent que l'activité enzymatique à 98 kDa pourrait être un complexe MMP2/TIMP2. Cependant, pour vérifier cette hypothèse, un western-blot avec un anticorps spécifique de TIMP-2 devra être réalisé.

La bande à laquelle nous nous sommes particulièrement intéressées est celle à 98 kDa car son intensité semble varier en fonction des incubations. Le U46619 et le 8-iso-PGF_{2α} augmentent l'activité enzymatique de cette MMP. Un pré-traitement avec les antagonistes du récepteur TP, le BM-520 et le SQ29548 atténue l'effet du U46619 ou du 8-iso-PGF_{2α}, indiquant que l'analogue du TXA₂ et le 8-iso-PGF_{2α} agiraient bien via le récepteur TP. De plus, l'augmentation de l'activité de cette MMP lorsque les cellules sont incubées en présence du U46619 ou du 8-iso-PGF_{2α} est probablement due à une augmentation de la sécrétion de l'enzyme puisque le niveau d'ARNm encodant la MMP2 augmente en parallèle.

La migration des SMCs de la média vers l'intima est une étape clé dans le processus d'athérogenèse. Elle est favorisée par une dégradation élevée de la matrice extracellulaire (Chandrasekar, Mummidhi et al. 2006). Les principales MMPs impliquées dans ce processus sont les MMP2 et MMP9 (Pauly, Passaniti et al. 1994) (Chandrasekar, Mummidhi et al. 2006). La MMP2 et la MMP9 ont pour rôle de dégrader un ou plusieurs composés (incluant du collagène de type I, III, IV, V et XI, des gélatines I et V et de l'élastine) ce qui favorise la migration cellulaire (Kenagy, Hart et al. 1997). Une étude réalisée sur des SMCs de rat a mis en évidence que la MMP2 était nécessaire pour envahir le Matrigel in vitro (Pauly, Passaniti et al. 1994). De plus, les MMPs doivent être actives pour permettre la migration cellulaire. Certaines MMPs présentes dans le milieu de culture sont sous la forme d'une pro-MMPs, forme inactive de la MMPs, et ne peuvent pas exercer leur fonction. Johnson et ses collaborateurs ont montré que les SMCs de souris déficientes en MMP2 et en MMP9 démontrent une diminution significative de la migration des SMCs, suggérant l'importance de ces deux MMPs dans le processus de migration cellulaire (Johnson and Galis 2004).

Nous avons donc étudié l'effet des deux agonistes du récepteur TP dans le processus de migration cellulaire. Les résultats montrent que le U46619 et le 8-iso-PGF_{2α} induisent la migration cellulaire. Cependant, il semble que la migration cellulaire soit plus importante quand les cellules sont incubées en présence du U46619. Un pré-traitement des antagonistes du récepteur TP diminue nettement cette migration cellulaire induite. Comme dit précédemment, la MMP2 et la MMP9 sont impliquées dans la migration SMCs. C'est pourquoi, nous avons voulu identifier la principale MMP impliquée dans ce processus de migration. Nous avons montré que l'inhibiteur de la MMP2 empêche la migration des AoSMCs, suggérant l'implication de la MMP2 dans le processus de migration des AoSMCs. D'autre part l'inhibiteur de la MMP9 n'a pas d'effet, ce qui est cohérent avec le fait que nous n'avons pas détecté d'ARNm encodant la MMP9 dans les cellules AoSMCs.

La prolifération des SMCs dans l'intima joue aussi un rôle important dans le processus athérogénique. Le TXA₂ et le 8-iso-PGF_{2α} sont connus pour stimuler la croissance mitogénique des SMCs (Kinsella 2001). Nous nous sommes dès lors intéressés à l'effet prolifératif potentiel des agonistes du récepteur TP. Dans ce mémoire, nous avons démontré que le U46619 induisait une augmentation de la prolifération des AoSMCs. Cette observation a été confirmée par différentes publications (Sachinidis, Flesch et al. 1995) (Fujino, Yuhki et al. 2002) ainsi que précédemment au laboratoire (mémoire de Diane Jacques). Les antagonistes du récepteur TP diminuent la prolifération induite par le U46619 confirmant que l'effet prolifératif du U46619 passerait par le récepteur TP. Contrairement au U46619, le 8-iso-PGF_{2α} n'influence pas la prolifération des AoSMCs, en tout cas à la concentration utilisée.

L'athérosclérose est une maladie caractérisée par une inflammation chronique. Même si les cellules endothéliales sont le principal type cellulaire au contact des monocytes et qu'elles régulent leur recrutement, les SMCs peuvent aussi interagir avec les macrophages au sein des plaques

athéromateuses et influencer leur phénotype inflammatoire. Ce processus pourrait être médié par l'expression de différentes molécules d'adhérence telles que ICAM-1 et VCAM-1 (Doran, Meller et al. 2008). Antonio J. Cayatte et ses collaborateurs ont démontré que le S18886, un antagoniste du récepteur TP, empêchait une expression élevée d'ICAM-1 lorsque les HUVEC étaient stimulées par le U46619 (Cayatte, Du et al. 2000).

Etant donné que peu de données sont disponibles concernant les cellules musculaires lisse humaines, nous avons étudié l'effet du U46619 et du 8-iso-PGF_{2α} seuls ou en association avec les antagonistes du récepteur TP sur l'expression de ICAM-1 et de VCAM-1. Cette étude a été réalisée à la fois aux niveaux transcriptionnel et protéique.

La quantification de l'ARNm de ICAM-1 montre une augmentation lorsque les cellules sont incubées en présence du U46619, alors que le 8-iso-PGF_{2α} n'a aucun effet. Les antagonistes du récepteur TP diminuent l'augmentation du niveau d'expression de l'ARNm du gène ICAM-1. En parallèle, l'IL-1β, une cytokine pro-inflammatoire présente dans les plaques athéromateuses mimant des conditions pro-inflammatoires et initiant ainsi l'adhérence des leucocytes et leur migration dans l'intima (Bernard, Melchior et al. 2008), induit également une augmentation du niveau d'ARNm encodant ICAM-1. Afin de confirmer ces résultats, un western-blot a été réalisé, qui a mis en évidence la surexpression d'ICAM-1 lorsque les cellules sont incubées en présence du U46619. Une diminution de cette expression induite d'ICAM-1 est observée lorsque les cellules sont incubées en présence des antagonistes du récepteur TP. L'augmentation de l'expression des molécules d'adhérence telles que ICAM-1, lorsque les cellules sont stimulées par un agoniste du récepteur TP, est un mécanisme potentiel par lequel le récepteur TP pourrait être impliqué dans la formation d'une lésion. Antonio J. Cayatte et ses collaborateurs ont observé une diminution du niveau ICAM-1 dans le sérum des souris ApoE^{-/-} traitées avec du S18886, suggérant que les antagonistes du récepteur TP pourraient influencer positivement l'athérosclérose (Cayatte, Du et al. 2000). De plus, une immunohistochimie des artères athérosclériques humaines a également démontré l'expression d'ICAM-1 sur les cellules endothéliales, les macrophages et les SMCs présents au niveau de la plaque athéromateuse (Poston, Haskard et al. 1992). Une immunofluorescence faite sur les AoSMCs pourrait aussi être réalisée pour prouver les effets des deux agonistes du récepteur TP.

Par ailleurs, le U46619 et le 8-iso-PGF_{2α} ne semblent pas influencer l'expression d'ARNm du gène VCAM-1. Par contre, l'IL-1β, induit l'expression d'ARNm encodant VCAM-1. Jennifer R. Gamble et ses collaborateurs ont montré que les SMCs présentes dans la plaque athéromateuse n'expriment pas VCAM-1. Ensuite, ils ont montré que l'expression de VCAM-1 est fortement induite dans les SMCs lorsque des cytokines comme IL-1 étaient secrétées par des monocytes (Gamble, Bradley et al. 1995). D'autre part, une étude a également démontré que l'expression de VCAM-1 sur les SMCs de l'intima était seulement induite dans des régions d'infiltration des cellules inflammatoires, suggérant la possibilité que les facteurs libérés par les cellules inflammatoires induiraient l'expression de VCAM-1 (O'Brien, Allen et al. 1993). En effet, un traitement des VSMCs de rat avec de l'IL-1β augmente l'expression de VCAM-1. De plus, lorsque ces cellules sont incubées en présence de U46619 et d'IL-1β, l'expression de VCAM-1 est aussi augmentée. Par ailleurs, le U46619 n'est pas capable à lui tout seul d'induire une augmentation de l'expression de VCAM-1 (Bayat, Xu et al. 2008). Ceci suggère que l'expression de VCAM-1 serait induite via l'IL-1β et non pas par les agonistes du récepteur TP. D'autre part, les cellules utilisées lors de ce travail sont d'origines humaines tandis que Bayat et ses collaborateurs ont travaillé sur des cellules de rats, ce qui peut expliquer la différence de résultat. En outre, la présence de VCAM-1 est aussi observée dans les SMCs des régions de l'aorte proche de

lésions athéromateuses chez les souris ApoE^{-/-}, suggérant l'implication de cet événement dans une étape d'initiation de l'athérosclérose (Braun, Pietsch et al. 1999).

En conclusion, nous avons pu observer trois effets importants induits par les agonistes du récepteur TP (le U46619 et le 8-iso-PGF_{2α}) sur les cellules musculaires lisses aortiques humaines (AoSMCs).

Premièrement, nous avons pu observer que le U46619 et le 8-iso-PGF_{2α} augmentent l'expression de MMPs dont la MMP2 et induisent une augmentation de l'activité enzymatique de la MMP2. Ces deux agonistes induisent aussi la migration des AoSMCs. Cette migration serait effectuée via la libération de MMP2. Nous avons aussi constaté que l'ajout d'un antagoniste du récepteur TP diminue à la fois l'expression de MMP2 et l'activité enzymatique de la MMP2. Il s'en suit une diminution de la migration cellulaire. Le BM-520 et le SQ29548 montrent des effets similaires suggérant que ces deux antagonistes du récepteur TP sont puissants.

Deuxièmement, le U46619 possède un effet prolifératif sur les AoSMCs. La prolifération des SMCs joue un rôle important et peut induire une fragilisation de la plaque athéromateuse. Les antagonistes du récepteur TP diminuent cette prolifération cellulaire.

Troisièmement, le U46619 induit une augmentation de l'expression de ICAM-1, qui est réduit par les antagonistes du récepteur TP.

On a donc montré que les agonistes du récepteur TP favorisent différents processus qui jouent des rôles importants dans l'athérogenèse. Ces effets sont inhibés par les antagonistes du récepteur TP. Les récepteurs TP constituent dès lors des cibles thérapeutiques intéressantes dans la prévention du développement de l'athérosclérose.

Les perspectives liées à ces résultats sont nombreuses. Ainsi, l'activation du récepteur TP peut déclencher différentes voies de transduction du signal. Or dans ce mémoire, nous nous sommes limités aux différents effets que pouvaient induire les MMPs. Il serait certainement intéressant d'analyser en priorité la voie de signalisation et les mécanismes transcriptionnels qui régulent l'expression de MMP2 suite à l'activation du récepteur TP par les deux agonistes.

VI. Bibliographie

V. Bibliographie

- Amalinei, C., I. D. Caruntu, et al. (2010). "Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions." Rom J Morphol Embryol **51**(2): 215-228.
- Assmann, G., P. Cullen, et al. (1999). "Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(8): 1819-1824.
- Bayat, H., S. Xu, et al. (2008). "Activation of thromboxane receptor upregulates interleukin (IL)-1beta-induced VCAM-1 expression through JNK signaling." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(1): 127-134.
- Bernard, Y., C. Melchior, et al. (2008). "Co-cultures of human coronary smooth muscle cells and dimethyl sulfoxide-differentiated HL60 cells upregulate ProMMP9 activity and promote mobility-modulation by reactive oxygen species." Inflammation **31**(5): 287-298.
- Bernardo, M. M. and R. Fridman (2003). "TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP." Biochem J **374**(Pt 3): 739-745.
- Boren, J., K. Olin, et al. (1998). "Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding." J Clin Invest **101**(12): 2658-2664.
- Braun, M., P. Pietsch, et al. (1999). "Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells." Cardiovasc Res **41**(2): 395-401.
- Brown, D. J., B. Lin, et al. (2004). "Elements of the nitric oxide pathway can degrade TIMP-1 and increase gelatinase activity." Mol Vis **10**: 281-288.
- Burke, J. E. and E. A. Dennis (2009). "Phospholipase A2 biochemistry." Cardiovasc Drugs Ther **23**(1): 49-59.
- Cayatte, A. J., Y. Du, et al. (2000). "The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice: evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(7): 1724-1728.
- Chandrasekar, B., S. Mummidi, et al. (2006). "Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-kappaB- and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin." J Biol Chem **281**(22): 15099-15109.
- Chapman, M. J. (1982). "[Lipoproteins and the liver (author's transl)]." Gastroenterol Clin Biol **6**(5): 482-499.
- Cyrus, T., Y. Yao, et al. (2007). "Thromboxane receptor blockade improves the antiatherogenic effect of thromboxane A2 suppression in LDLR KO mice." Blood **109**(8): 3291-3296.
- Dogne, J. M., J. Hanson, et al. (2005). "Thromboxane, prostacyclin and isoprostanes: therapeutic targets in atherogenesis." Trends Pharmacol Sci **26**(12): 639-644.

- Doran, A. C., N. Meller, et al. (2008). "Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol 28(5): 812-819.
- Feletou, M. and P. M. Vanhoutte (2006). "Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture)." Am J Physiol Heart Circ Physiol 291(3): H985-1002.
- Fujino, T., K. Yuhki, et al. (2002). "Effects of the prostanoids on the proliferation or hypertrophy of cultured murine aortic smooth muscle cells." Br J Pharmacol 136(4): 530-539.
- Gamble, J. R., S. Bradley, et al. (1995). "TGF-beta and endothelial cells inhibit VCAM-1 expression on human vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol 15(7): 949-9
- Gimbrone, M. A., Jr. (1999). "Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis." Am J Pathol 155(1): 1-5.
- Glass, C. K. and J. L. Witztum (2001). "Atherosclerosis. the road ahead." Cell 104(4): 503-516.
- Goldberg, I. J., C. A. Scheraldi, et al. (1990). "Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV." J Biol Chem 265(8): 4266-4272.
- Gough, P. J., I. G. Gomez, et al. (2006). "Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice." J Clin Invest 116(1): 59-69.
- Gryglewski, R. J. (2008). "Prostacyclin among prostanoids." Pharmacol Rep 60(1): 3-11.
- Hinsdale, M. E., P. M. Sullivan, et al. (2002). "ApoB-48 and apoB-100 differentially influence the expression of type-III hyperlipoproteinemia in APOE*2 mice." J Lipid Res 43(9): 1520-1528.
- Huang, J. S., S. K. Ramamurthy, et al. (2004). "Cell signalling through thromboxane A2 receptors." Cell Signal 16(5): 521-533.
- Huo, Y. and K. Ley (2001). "Adhesion molecules and atherogenesis." Acta Physiol Scand 173(1): 35-43.
- Illingworth, D. R. (1993). "Lipoprotein metabolism." Am J Kidney Dis 22(1): 90-97.
- Johnson, C. and Z. S. Galis (2004). "Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization." Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(1): 54-60
- Kaden, J. J., C. E. Dempfle, et al. (2003). "Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis." Atherosclerosis 170(2): 205-211.
- Kenagy, R. D., C. E. Hart, et al. (1997). "Primate smooth muscle cell migration from aortic explants is mediated by endogenous platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor acting through matrix metalloproteinases 2 and 9." Circulation 96(10): 3555-3560.
- Kinsella, B. T. (2001). "Thromboxane A2 signalling in humans: a 'Tail' of two receptors." Biochem Soc Trans 29(Pt 6): 641-654.
- Kobayashi, T., Y. Tahara, et al. (2004). "Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice." J Clin Invest 114(6): 784-794.

- Kockx, M., W. Jessup, et al. (2008). "Regulation of endogenous apolipoprotein E secretion by macrophages." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(6): 1060-1067.
- Kukacka, J., R. Prusa, et al. (2005). "Matrix metalloproteinases and their function in myocardium." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **149**(2): 225-236.
- Kuzuya, M., K. Nakamura, et al. (2006). "Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(5): 1120-1125.
- Li, H., J. Liang, et al. (2007). "FoxO4 regulates tumor necrosis factor alpha-directed smooth muscle cell migration by activating matrix metalloproteinase 9 gene transcription." Mol Cell Biol **27**(7): 2676-2686.
- Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-874.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-241.
- Milne, G. L., H. Yin, et al. (2008). "Human biochemistry of the isoprostane pathway." J Biol Chem **283**(23): 15533-15537.
- Nakahata, N. (2008). "Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology." Pharmacol Ther **118**(1): 18-35.
- Nestel, P. J. (1987). "High-density lipoprotein turnover." Am Heart J **113**(2 Pt 2): 518-521.
- Newby, A. C. (2005). "Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture." Physiol Rev **85**(1): 1-31.
- O'Brien, K. D., M. D. Allen, et al. (1993). "Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis." J Clin Invest **92**(2): 945-951.
- Ohshima, S., A. Petrov, et al. (2009). "Molecular imaging of matrix metalloproteinase expression in atherosclerotic plaques of mice deficient in apolipoprotein e or low-density-lipoprotein receptor." J Nucl Med **50**(4): 612-617.
- Olofsson, S. O., O. Wiklund, et al. (2007). "Apolipoproteins A-I and B: biosynthesis, role in the development of atherosclerosis and targets for intervention against cardiovascular disease." Vasc Health Risk Manag **3**(4): 491-502.
- Overall, C. M., E. Tam, et al. (2000). "Domain interactions in the gelatinase A.TIMP-2.MT1-MMP activation complex. The ectodomain of the 44-kDa form of membrane type-1 matrix metalloproteinase does not modulate gelatinase A activation." J Biol Chem **275**(50): 39497-39506.
- Oviedo-Orta, E., A. Bermudez-Fajardo, et al. (2008). "Comparison of MMP-2 and MMP-9 secretion from T helper 0, 1 and 2 lymphocytes alone and in coculture with macrophages." Immunology **124**(1): 42-50.
- Pauly, R. R., A. Passaniti, et al. (1994). "Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation." Circ Res **75**(1): 41-54.

- Peto, R., A. D. Lopez, et al. (1992). "Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics." Lancet **339**(8804): 1268-1278.
- Poston, R. N., D. O. Haskard, et al. (1992). "Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques." Am J Pathol **140**(3): 665-673.
- Pratico, D., J. A. Lawson, et al. (2001). "The isoprostanes in biology and medicine." Trends Endocrinol Metab **12**(6): 243-247.
- Reape, T. J. and P. H. Groot (1999). "Chemokines and atherosclerosis." Atherosclerosis **147**(2): 213-225.
- Rolin, S., J. Hanson, et al. (2007). "BM-520, an original TXA2 modulator, inhibits the action of thromboxane A2 and 8-iso-prostaglandin F2alpha in vitro and in vivo on human and rodent platelets, and aortic vascular smooth muscles from rodents." Prostaglandins Other Lipid Mediat **84**(1-2): 14-23.
- Rouffy, J., B. Chanu, et al. (1983). "[Lipids, lipoproteins, apoproteins and clinical arteriopathic manifestations]." Pathol Biol (Paris) **31**(4): 261-270.
- Rouzer, C. A. and L. J. Marnett (2009). "Cyclooxygenases: structural and functional insights." J Lipid Res **50** Suppl: S29-34.
- Schaefer, E. J. and R. I. Levy (1985). "Pathogenesis and management of lipoprotein disorders." N Engl J Med **312**(20): 1300-1310.
- Sachinidis, A., M. Flesch, et al. (1995). "Thromboxane A2 and vascular smooth muscle cell proliferation." Hypertension **26**(5): 771-780.
- Serhan, C. N., M. Hamberg, et al. (1984). "Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(17): 5335-5339.
- Scholz, H., P. Aukrust, et al. (2004). "8-isoprostane increases scavenger receptor A and matrix metalloproteinase activity in THP-1 macrophages, resulting in long-lived foam cells." Eur J Clin Invest **34**(7): 451-458.
- Tabas, I. (2009). "Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress." Antioxid Redox Signal **11**(9): 2333-2339.
- Tang, M., T. Cyrus, et al. (2005). "Involvement of thromboxane receptor in the proatherogenic effect of isoprostane F2alpha-III: evidence from apolipoprotein E- and LDL receptor-deficient mice." Circulation **112**(18): 2867-2874.
- Viles-Gonzalez, J. F., V. Fuster, et al. (2005). "Atherosclerosis regression and TP receptor inhibition: effect of S18886 on plaque size and composition--a magnetic resonance imaging study." Eur Heart J **26**(15): 1557-1561.
- Warner, T. D. and J. A. Mitchell (2002). "Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum?" Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13371-13373.
- Woessner, J. F., Jr. (1991). "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling." FASEB J **5**(8): 2145-2154.
- Ye, S. (2006). "Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome." Cardiovasc Res **69**(3): 636-645.

Zhao, H., M. M. Bernardo, et al. (2004). "Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation." J Biol Chem 279(10): 8592-8601.